

SÉRIE A, N° 380.

N° D'ORDRE :

404.

THÈSES

PRÉSENTÉES

À LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PAR

MINA NADEL

1^{re} THÈSE. — SUR LA MESURE DE L'OUVERTURE DES STOMATES
(CRITIQUE DE LA MÉTHODE DE FIXATION DES STOMATES PAR
L'ALCOOL).

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTE

Soutenues le **novembre 1938** devant la Commission d'examen.

17 NOV 1938

MM. R. COMBES *Président.*

L. PLANTFOL
G. MANGENOT } *Examineurs.*

TEL-AVIV

IMPRIMERIE M. SHOHAM

1938

SÉRIE A, N° 380.

N° D'ORDRE :

404.

THÈSES

PRÉSENTÉES

À LA FACULTÉ DES SCIENCES

DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PAR

MINA NADEL

1^{re} THÈSE. — SUR LA MESURE DE L'OUVERTURE DES STOMATES
(CRITIQUE DE LA MÉTHODE DE FIXATION DES STOMATES PAR
L'ALCOOL).

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le novembre 1938 devant la Commission d'examen.

MM. R. COMBES	<i>Président.</i>
L. PLANTFOL	} <i>Examineurs.</i>
G. MANGENOT	

MM.

Doyen honoraire . . . M. MOLLIARD.

Doyen C. MAURAIN, *Professeur*, Physique du Globe.

Professeurs honoraires



H. LEBESGUE.
A. FERNBACH.
Emile PICARD.
Léon BRILLOUIN.
GUILLET.
PÉCHARD.
FREUNDLER.
AUGER.

BLAISE.
DANCEARD.
LESPIEAU.
MARCHIS.
VESSIOT.
PORTIER.
MOLLIARD.
LAPICQUE.

G. BERTRAND.
ABRAHAM.
Ch. FABRY.
Léon BERTRAND.
WINTREBERT.
DUBOSCQ.
BOHN.

PROFESSEURS

M. CAULLERY . T Zoologie (Evolution des êtres organisés).
G. URBAIN . . . T Chimie générale.
Emile BOREL . . T Calcul des probabilités et Physique mathématique.
Jean PERRIN . . T Chimie physique.
E. CARTAN . . . T Géométrie supérieure.
A. COTTON . . . T Recherches physiques.
J. DRACH T Analyse supérieure et Algèbre supérieure.
Charles PÉREZ . T Zoologie.
E. RABAUD . . . T Biologie expérimentale.
M. GUICHARD . . Chimie minérale.
Paul MONTEL . . T Théorie des fonctions et Théorie des transformations.
L. BLARINGHEM T Botanique.
G. JULIA T Mécanique analytique et Mécanique céleste.
C. MAUGUIN . . . T Minéralogie.
A. MICHEL-LÉVY T Pétrographie.
H. BENARD . . . T Mécanique expérimentale des fluides.
A. DENJOY . . . T Application de l'analyse à la Géométrie.
L. LUTAUD T Géographie physique et géologie dynamique.
Eugène BLOCH . T Physique.
G. BRUHAT . . . T Physique théorique et physique céleste.
E. DARMOIS . . . T Enseignement de Physique.
A. DEBIERNE . . T Physique Générale et Radioactivité.
A. DUFOUR . . . T Physique (P. C. B.).
L. DUNOYER . . . T Optique appliquée.
A. GUILLIERMOND T Botanique.
M. JAVILLIER . . T Chimie biologique.
ROBERT-LEVY . . T Physiologie comparée.
F. PICARD Zoologie (Evolution des êtres organisés).
Henry VILLAT . T Mécanique des fluides et applications.
Ch. JACOB T Géologie.
P. PASCAL T Chimie minérale.
M. FRÉCHET . . . T Calcul différentiel et Calcul intégral.
E. ESCLANGON . T Astronomie.
Mme RAMART-LUCAS T Chimie organique.
H. BÉGHIN T Mécanique physique et expérimentale.

FOCH Mécanique expérimentale des fluides.
PAUTHENIER . . Physique (P. C. B.).
DE BROGLIE . . . T Théories physiques.
CHRÉTIEN Optique appliquée.
P. JOB Chimie générale.
LABROUSTE . . . Physique du Globe.
PRENANT T Anatomie et Histologie comparées.
VILLEY Mécanique physique et expérimentale.
COMBES T Physiologie végétale.
GARNIER T Mathématiques générales.
PÈRES Mécanique théorique des fluides.
HACKSPILL . . . Chimie (P. C. B.).
LAUGIER T Physiologie générale.
TOUSSAINT . . . Technique Aéronautique.
M. CURIE Physique (P. C. B.).
G. RIBAUD T Hautes températures.
CHAZY T Mécanique rationnelle.
GAULT Chimie (P. C. B.).
CROZE Recherches physiques.
DUPONT T Théories chimiques.
LANQUINE T Géologie structurale et Géologie appliquée.
VALIRON Mathématiques générales.
BARRABÉ Géologie structurale et géologie appliquée.
MILLOT Biologie animale (P. C. B.).
F. PERRIN Théories physiques.
VAVON Chimie organique.
G. DARMOIS . . . Calcul des probabilités et Physique-Mathématique.
CHATTON T Biologie maritime.
AUBEL Chimie biologique.
J. BOUQCART . . Géographie physique et Géologie dynamique.
Mme JOLIOT-CURIE Physique générale et Radioactivité.
PLANTEFOL . . . Biologie végétale (P. C. B.).
CABANNES Enseignement de Physique.
GRASSÉ Biologie animale (P. C. B.).
PRÉVOST Chimie (P. C. B.).

Secrétaire A. PACAUD.

Secrétaire honoraire . . . D. TOMBECK.

A mon frère
DAVIDE NADEL



Digitized by the Internet Archive
in 2026

SUR LA MESURE DE L'OUVERTURE DES STOMATES

(CRITIQUE DE LA METHODE DE FIXATION DES STOMATES PAR L'ALCOOL)

par MINA NADEL.

SOMMAIRE

	Page
INTRODUCTION	6
Revue des méthodes de mesure de stomates.....	8
Mode de réalisation de nos expériences.....	14
I. CRITIQUE DES METHODES DE CONTROLE ET DE LA FACON DE LES APPLIQUER	17
a) Influence de l'ablation des feuilles sur les stomates.....	17
b) L'observation directe:	20
1. L'illuminateur "Opak".....	20
2. L'immersion dans l'huile de paraffine.....	22
3. L'observation des coupes à sec.....	25
c) Méthode indirecte: l'infiltration.....	25
II. DANS QUELS CAS LA METHODE DE LLOYD EST-ELLE APPLICABLE?	27
a) Classification des feuilles suivant leur anatomie.....	27
1. Groupe I à épiderme adhérent.....	28
2. Groupe II de transition.....	31
3. Groupe III à épiderme détachable.....	34
b) Origine des mouvements stomatiques défavorables à la méthode de fixation.	41
c) Courbures des coupes épidermiques.....	43
d) Conclusions.....	45
III. MODIFICATIONS DE LA METHODE DE FIXATION.....	46
a) Alcool à 96°.....	46
b) Fixatifs cytologiques.....	47
c) Dioxane et acétone.....	48
IV. MOUVEMENTS DE GONFLEMENT POSTMORTELS.....	51
V. HISTOCHIMIE ET ANATOMIE DES STOMATES ETUDIÉS.....	56
RESUME.....	60
BIBLIOGRAPHIE.....	62

INTRODUCTION

Le but de ce travail est la recherche des limites d'application de la méthode de fixation des stomates par l'alcool (méthode de LLOYD). Pour cela, nous allons essayer de déterminer les types de plantes auxquelles cette méthode est applicable et les modalités de son utilisation. En outre on se propose d'examiner de plus près le mécanisme de la fixation des membranes stomatiques du point de vue physico-chimique.

Nous avons montré dans une précédente publication (35) l'impossibilité d'appliquer la méthode de LLOYD au *Citrus sinensis* et *Ceratonia Siliqua*. Dans ce présent travail, les plantes étudiées sont :

<i>Ficus nitida</i> Blume	<i>Pisum sativum</i> L.
<i>Beta vulgaris</i> L.	<i>Citrus sinensis</i> Osb.
<i>Chenopodium murale</i> L.	<i>Dodonaea viscosa</i> L.
<i>Albersia Blitum</i> Kunth	<i>Eucalyptus rostrata</i> Schlecht.
<i>Portulaca oleracea</i> L.	<i>Vinca rosea</i> L.
<i>Brassica oleracea</i> L.	<i>Solanum tuberosum</i> L.
<i>Pittosporum Tobira</i> Ait.	<i>Solanum nigrum</i> L.
<i>Rosa</i> "Dorothy Perkins"	<i>Plantago Lagopus</i> L.
<i>Ceratonia Siliqua</i> L.	<i>Calendula officinalis</i> L.
<i>Medicago sativa</i> L.	

Depuis longtemps, la connaissance de la grandeur des ouvertures des stomates a été considérée comme fondamentale pour la solution de nombreux problèmes physiologiques. Il n'y a plus de doute que l'intensité des échanges gazeux soit fortement influencée par le degré d'ouverture des stomates.

D'après différents auteurs, il y a une corrélation intime entre l'intensité de la transpiration et le degré d'ouverture stomatique. Tandis que LLOYD (28) et KNIGHT (24, 25) doutaient de l'existence de cette relation, STALFELT (57) l'a réétablie dans ses recherches récentes, que nous considérons comme fondamentales.

Différents auteurs insistent sur le fait, que la grandeur de l'assimilation chlorophyllienne est aussi influencée par la largeur d'ouverture des stomates. STALFELT (54) a observé chez le *Picea excelsa* une certaine relation entre la largeur d'ouverture des stomates et l'intensité de cette assimilation.

Non seulement pour les processus physiologiques, comme la transpiration et les autres formes d'échanges gazeux, mais même pour certains problèmes de la pathologie végétale, la connaissance de la largeur des stomates est d'une importance capitale.

BOGDARINA (5) et d'autres auteurs ont trouvé une relation évidente entre la grandeur d'ouverture des stomates et la sensibilité des plantes aux brûlures. Selon BOGDARINA, c'est aussi par les stomates que les huiles anticryptogamiques entrent dans les tissus des feuilles. Il est donc utile de savoir quand les stomates sont ouverts, pour déterminer le moment où il faut appliquer ces traitements.

RADULESCU (44) a établi que le degré d'ouverture des stomates est lié à la plus ou moins grande résistance des blés au *Puccinia glumarum tritici*.

On voit donc, que pour des recherches différentes, il est utile de connaître l'état d'ouverture des stomates.

REVUE DES METHODES DE MESURE DE STOMATES.

La littérature physiologique offre plusieurs méthodes de mesure des ouvertures stomatiques. Mais, si l'on veut choisir la méthode la mieux appropriée, on éprouve des difficultés: souvent, une méthode très appréciée par un auteur est tout à fait combattue par un autre. Il apparaîtra précisément comme une conséquence de notre travail que le choix de la méthode dépend uniquement de la plante qui doit être étudiée.

I. *Méthodes directes.* 1. Il va sans dire, que la méthode la plus convenable serait l'observation directe sur la feuille vivante. Mais ce n'est possible que chez un nombre restreint de plantes, à cause de l'opacité de la feuille, de la présence de poils et parfois de la petitesse des stomates. Déjà KOHL (26) et EBERDT (10) ont fait des observations directes sur les feuilles d'*Alisma Plantago, aquatica* L. et *Trianea* (= *Limnobiium*) *begotensis*.

2. Il est évident que les méthodes qui se rapprochent le plus de l'observation directe seront les mieux appréciées. Dans certaines publications parues vers la fin du XIXème siècle, on trouve de telles notions sur les mesures d'ouverture des stomates. SCHWENDENER, dans son oeuvre classique (50), s'en occupait déjà. Il observa à sec des coupes superficielles d'épidermes, entre lame et lamelle (p. 863), pour éviter l'endosmose de l'eau. Mais, d'après lui, cette méthode ne semblait pas très appropriée. SCHORN (48) l'a aussi utilisée, mais sans succès.

Nous avons observé à sec les épidermes de *Brassica oleracea*, *Vinca rosea*, *Medicago sativa* et autres, et dans tous ces cas, nous avons pu mesurer la largeur d'ouverture des stomates. Comme on le verra au cours de ce travail, il y a en général quelques minutes pendant lesquelles les ouvertures ne subissent pas de changements; ce temps suffit à effectuer les mesures.

3. SCHWENDENER observa aussi les stomates (coupes d'épidermes) dans l'eau pour mesurer leur ouverture. Mais il a énoncé déjà la crainte que l'eau ne préserve pas l'état naturel d'ouverture *in vivo* et que des changements postérieurs aient lieu. Il dit (p. 862), qu' "en mettant les coupes superficielles d'épiderme dans l'eau, celle-ci traverse vite les membranes internes d'épiderme et provoque une

augmentation de la turgescence dont la conséquence est, que les stomates „qui n'ont pas changé jusqu'alors, deviennent comprimés et se ferment". SCHWENDENER ajoute (p. 863), que lorsque "les cellules vertes" sont coupées avec l'épiderme, l'ouverture des stomates n'est pas changée pendant un certain temps. Il présume, que les cellules du mésophylle gênent la pénétration de l'eau par les membranes internes de l'épiderme.

LLOYD (28), p. 24, a mesuré les stomates de *Verbena ciliata* dans l'air, à sec, et puis, en ajoutant de l'eau, et il a pu constater que les stomates élargissent leurs ouvertures dans l'eau. Il pense donc, qu'en observant les stomates dans l'eau, on ne peut rien dire de leurs conditions *in situ* et *in vivo*. A un autre endroit (p. 25), il insiste sur le fait, que les différences dans les ouvertures des stomates, observés dans l'eau, par rapport à l'observation à sec, sont dues à l'introduction de l'eau dans les cellules de fermeture.

4. En 1908, LLOYD a utilisé une autre méthode qui, depuis ce temps, est très appliquée et qui s'est généralisée comme méthode d'investigation sur l'ouverture des stomates. Elle consiste à prélever un morceau d'épiderme et à le plonger rapidement dans l'alcool absolu. D'après LLOYD, l'alcool, par son action déshydratante, fixe et durcit instantanément les stomates, en les gardant dans l'état naturel d'ouverture où ils se trouvaient *in vivo*.

Diverses observations semblent restreindre la valeur de la méthode, en précisant les conditions d'emploi. LOFTFIELD (29) indique que, pour que cette méthode soit efficace, il faut agir très vite. L'action ne doit pas durer plus de deux secondes. De même, ALEXANDER et CHAKHNASHVILI (1) soulignent qu'ils ont pris différentes précautions (deux personnes ont fait le travail), pour pouvoir effectuer cette opération très rapidement. Nous démontrerons au cours de cet article, que cette vitesse exagérée n'est pas nécessaire.

Le fait qu'il y a des cas où cette méthode ne saurait être appliquée, p. ex. chez *Citrus*, a été démontré récemment par OPPENHEIMER et MENDEL (39) et par NADEL (35).

5. STALFELT (56) utilise une observation directe sur les feuilles entières ou des petits morceaux de feuilles, trempés dans l'huile de paraffine. Il les observe à l'aide d'un objectif à immersion, sans couvrir avec une lamelle. Le plus souvent, il utilise des morceaux

de 0,5 cm², coupés entre deux nervures secondaires. Il choisit dans la région médiane de ce morceau 10 stomates se trouvant à telle distance l'un de l'autre, que tout le morceau de la feuille soit parcouru. Il les mesure avec un micromètre et détermine la moyenne. Les contours sont spécialement nets quand on met, comme en photographie, une étoffe noire autour de la tête et de l'instrument.

Cette méthode nous a rendu de bons services. Elle s'appliquait à tous nos sujets, sauf aux feuilles très épaisses de *Ceratoma*, *Pittosporum*, *Ficus* et quelquefois de *Citrus*. La cause en est, comme PISEK (42), p. 625, le mentionne, que "des feuilles plus épaisses, ou ayant des cellules plus serrées, absorbent tellement de lumière, que l'on ne peut pas distinguer nettement la fente centrale."

6. Une autre méthode d'observation directe applicable même aux feuilles épaisses, est l'observation sur les feuilles vivantes au moyen de la lumière réfléchie au lieu de la lumière transmise qu'utilisent les méthodes précédentes. Nous nous sommes servi pour cela de l'appareil appelé l'illuminateur "Opak" de la firme Leitz. PAERTZ (41) s'en sert avec succès. SIERP (51) l'emploie pour l'*Helianthus annuus*. HARTSUIJKER (22) s'est servi de cet appareil pour juger de la valeur de la méthode porométrique. D'après lui, les mesures exactes à l'aide de cet illuminateur sont difficiles à exécuter chez des plantes à stomates enfoncés. SCHORN (48) aussi a vu, que cet illuminateur ne convient pas à ces sortes de stomates.

Nos observations s'accordent avec celles de ces auteurs et de PISEK (42) p. 625, qui mentionne que "cette méthode convient à l'observation des stomates, ayant une antichambre peu développée et une ouverture extérieure relativement grande, — bref, ayant la fente centrale le plus dégagée qu'il soit possible." Ce type est bien répandu chez les plantes herbacées. Nous avons aussi pu constater sur nos sujets à stomates non enfoncés, que l'observation à l'aide de l'illuminateur "Opak" (objectifs No. 5 et 7) est plus nette pour certaines plantes que pour d'autres.

Comme on le verra par la suite, la plupart de nos plantes se prêtaient à l'observation en utilisant l'illumination par en haut. PISEK (42) a utilisé récemment l'illuminateur "Epilum" — appareil de nouvelle construction des ateliers optiques de REICHERT — Vienne. Mais notre illuminateur "Opak" de Leitz nous a rendu aussi de bons services.

7. Il existe encore une autre méthode pour mesurer les stomates, introduite par BUSCAGLIONI et POLLACCI (6). Elle est basée sur la propriété des solutions éthérées de collodion de se troubler, quand elles viennent en contact avec la vapeur d'eau. On étale le collodion avec un pinceau sur la surface de la feuille; une membrane se produit qui, le plus souvent, est facile à enlever et possède des empreintes des cellules épidermiques et des stomates, dont on peut mesurer les ouvertures.

Se basant sur le même principe, ARTSIKHOVSKAIA (2) a utilisé une solution de gélatine à 10% pour l'étude du développement des stomates des espèces suivantes: *Populus tremula*, *Quercus* sp., *Salix* sp.

HARTSUIJKER (22), qui a utilisé la méthode du collodion, a constaté que l'éther influence les stomates; il provoque, pour la plupart, leur fermeture, — ce qui est d'accord avec nos observations (35), p. 27. — ou bien, quelquefois, une ouverture excessive, que cet auteur n'observait jamais *in vivo*.

II. *Méthodes indirectes*. — En outre des méthodes directes, il y a certaines *méthodes indirectes*, qui permettent de juger approximativement de l'état d'ouverture des stomates.

1. En 1911, DARWIN et PERTZ (8) ont construit le poromètre bien connu, qui est basé sur le principe suivant: la grandeur de l'ouverture des stomates peut être estimée à l'aide de la vitesse de l'air qui traverse la feuille.

HAMORAK et LUBYSKYJ ont construit un poromètre horizontal. Plusieurs auteurs, comme BACHMANN (4), LEICK (27) et surtout NIUS (36) ont trouvé des objections à la méthode porométrique. Ils ont prétendu, que les temps porométriques chez beaucoup de plantes sont plutôt proportionnels aux volumes des espaces intercellulaires qu'aux ouvertures des stomates.

GRAFE (14), comparant la méthode de LLOYD (28) à celle du poromètre, souligne les avantages de cette dernière. Le poromètre donne la moyenne de l'état de plusieurs centaines de stomates, tandis qu'à l'aide de la méthode de LLOYD (28), selon GRAFE, nous ne pouvons nous permettre de mesurer qu'une quantité limitée de stomates.

GREGORY et PEARSE (15) ont fait certaines modifications au poromètre, et à l'aide de leur méthode, ils croient obtenir de bons résultats. De même, MOLOTKOVSKII (34) décrit certaines modifications de cet appareil.

MAXIMOW (32) s'élève contre cette méthode en disant: "Comme méthode qualitative, elle est inférieure à la méthode de l'alcool absolu ou aux mesures obtenues directement sur les feuilles vivantes."

Cependant, il y a des auteurs qui ont utilisé cette méthode avec succès. Ainsi, OPPENHEIM (37) l'utilise pour l'étude des variations journalières de l'ouverture des stomates de *Citrus*. — HARTSUIJKER (22) démontre de même, que cette méthode est satisfaisante en la comparant à l'observation directe à l'aide de l'illuminateur vertical, avec lequel les mesures s'accordent.

2. La méthode bien connue de STAHL (53), qui utilise du papier imprégné d'un sel de cobalt, est plutôt une méthode de mesure de la transpiration que de mesure des ouvertures des stomates.

3. Une méthode simple et mieux utilisable dans les conditions naturelles est la méthode d'infiltration de MOLISCH (33) et STEIN (58). Elle est basée sur l'observation suivante: si une goutte d'un certain liquide, à tension superficielle et viscosité faibles, est placée sur la surface de la feuille, elle sera immédiatement absorbée par la capillarité et remplira les plus proches espaces intercellulaires, si les stomates sont ouverts. En fait, il en est bien ainsi: des points sombres apparaissent, s'agrandissent et se multiplient graduellement. Pour apprécier le degré d'ouverture, on emploie des liquides de tension superficielle et viscosité différentes.

Cette méthode simple et facile à appliquer, est largement employée et doit être considérée comme la plus appropriée pour des observations approximatives concernant l'état des stomates. Les résultats ne permettent qu'un jugement général sur leur degré d'ouverture. Quelques auteurs croient même, que la pénétration indique seulement si les stomates sont ouverts ou fermés.

Plusieurs auteurs préconisent des séries de liquides différents. STAHL (53) utilise de l'huile de paraffine, du pétrole et de l'éther de pétrole respectivement, à la place de l'alcool absolu, du benzol et du

xylol, préconisés par MOLISCH (33) et STEIN (58). D'après la série de DIETRICH (9), nous avons utilisé les 4 liquides d'infiltration suivants: xylol, pétrole, huile de ricin mélangée avec l'huile de térébenthine dans la proportion 1:2, et huile de paraffine.

Mme SCHORN (48) a employé dans ses expériences seulement deux liquides: l'alcool isobutylique qui pénètre facilement dans la feuille et le glycol éthylénique, qui ne s'y infiltre pas du tout. Elle a mélangé les deux liquides dans des proportions variées, commençant avec du glycol pur et ajoutant graduellement de l'alcool isobutylique dans les proportions 1:9, 2:8, 3:7, etc., obtenant ainsi une série de onze solutions, qu'elle a appliquées dans ses expériences.

Sur les objets étudiés par nous, nous avons pu observer que la méthode d'infiltration ne nous a donné que des résultats approximatifs. Dans le cas où les autres méthodes n'ont pas pu être appliquées, celle-ci nous a cependant rendu de grands services.

4. Dans le même ordre d'idées, WEBER (62) a proposé l'emploi des vapeurs ammoniacales. Quand les stomates sont ouverts, les vapeurs pénètrent et causent un brunissement des tissus.

* * *

Nous avons jusqu'ici indiqué les différentes méthodes essentielles employées pour l'étude des mouvements stomataires. La méthode qu'il convient de choisir dépend de la plante à laquelle on veut l'appliquer, à cause de la diversité des feuilles, des stomates et de leurs réactions physiologiques. Par exemple la méthode au collodion (HARTSUIJKER (22) p. 517) ne peut pas être appliquée aux feuilles très poilues et aux feuilles couvertes d'une couche épaisse de cire; l'observation directe dans l'huile paraffine est difficile à appliquer aux feuilles épaisses, comme celles de *Citrus* par exemple, et de *Ficus nitida*. Comme nous l'avons vu, les stomates profondément enfoncés et avec antichambre, ne peuvent pas être mesurés à l'aide de l'illuminateur "Opak" (HARTSUIJKER (22), p. 526). Enfin, il y a des stomates qui réagissent très vite aux influences extérieurs, comme la lumière. HARTSUIJKER (22) p. 518, a trouvé, que "les stomates de *Pelargonium peltatum* ont une capacité de réaction très grande, c'est à dire qu'ils réagissent assez vite quand on les met dans l'obscurité; de tels stomates réagissent aussi très vite sous l'influence de l'éther." La méthode au collodion ne pouvait pas

être appliquée aux stomates des plantes étudiées par lui, puisque l'éther influence l'état d'ouverture. — Aussi, les méthodes d'observation directe, utilisables au laboratoire (méthode à la paraffine; illuminateur "Opak") doivent être appliquées avec précaution pour les stomates qui réagissent très vite à la lumière. Nous verrons qu'une pareille vitesse de réaction existe chez *Solanum nigrum* et *Portulaca oleracea*, étudiés par nous.

Ce n'est pas seulement le stomate lui-même qui intervient dans le choix d'une méthode, mais aussi la nature de la feuille et de l'épiderme. Il y a des feuilles à épiderme plus ou moins adhérent au mésophylle, et on verra que pour la méthode de LLOYD, il n'est pas indifférent que l'épiderme soit adhérent ou non.

MODE DE REALISATION DE NOS EXPERIENCES.

Le but de cette recherche étant uniquement l'étude critique d'une méthode, on n'a pas tenu compte des relations entre les ouvertures des stomates et la transpiration. Pendant le prélèvement des échantillons on n'a que grossièrement pris en considération les conditions météorologiques et leurs influences sur les ouvertures, mais on n'a pas tiré de conséquences de ces relations. On s'en est servi seulement pour connaître grossièrement l'intensité de la transpiration.

Déterminations relatives à l'ouverture des stomates. — On a généralement pris une feuille entière pour chaque méthode d'observation. Mais pour éviter le plus possible les erreurs dues à l'individualité des feuilles, on a exécuté dans d'autres séries d'observations des coupes d'épidermes d'une même feuille: un morceau pour la fixation dans l'alcool, un autre pour les mesures dans la paraffine et un troisième pour l'observation à l'aide de l'illuminateur "Opak". Dans le cas où c'était possible (grandes feuilles), on a utilisé de plus la méthode d'infiltration sur la même feuille. L'exécution de plusieurs coupes sur la même feuille ne nous semble pas influencer les résultats de nos observations des stomates *in situ*, puisque ceux-ci ne se trouvaient pas au voisinage immédiat des bords de la coupe (où l'état d'ouverture n'est souvent pas typique), mais toujours au milieu d'un assez grand morceau.

SOLOVSKY-IRTEL v. BRENNDOFF (52) écrit, qu' "une même feuille peut fournir plusieurs lambeaux, à condition de laisser entre

chaque opération le temps nécessaire au rétablissement du tissu irrité." Malheureusement, on ne trouve pas dans son mémoire quel en est le temps nécessaire et sur quelles expériences elle s'appuie.

Afin de vérifier l'exactitude des mesures obtenues avec la méthode de LLOYD à l'aide de l'illuminateur "Opak", on a observé une région de la feuille avec ce dernier, en mesurant les stomates: Puis, en cet endroit, on a coupé l'épiderme, parfois avec du mésophylle, et parfois sans mésophylle, en mettant les coupes ensuite dans l'alcool. Il va sans dire qu'on a utilisé des plantes dont on s'était assuré d'abord à l'aide d'observations continues avec l'illuminateur "Opak", que pendant le temps nécessaire pour cette opération, les stomates ne réagissent pas à la lumière.

De même, on a comparé les observations faites sur les préparations à sec à l'aide de l'illuminateur "Opak", avec celles qui ont été trempées dans la paraffine: après avoir mesuré les stomates avec l'illuminateur, on a recouvert les coupes (le morceau de feuille ou la feuille entière) de paraffine, en observant le même endroit d'après la méthode de STALFELT (56).

Pour étudier l'influence de différents liquides sur les mêmes stomates, nous changeons les liquides pendant le séjour du sujet sous le microscope. Comme d'ordinaire, l'un des liquides est enlevé avec un papier filtre d'un côté de la lamelle, et on le remplace par des gouttes d'un deuxième liquide, appliqué de l'autre côté. Dans le cas où les liquides ne se mélangent pas, la lamelle est enlevée avant cette manipulation, ce qui facilite l'enlèvement du premier liquide.

Afin de ne pas perdre de vue, pendant le changement de liquides, les stomates étudiés, on a dessiné la plage de l'épiderme observé.

Dans tous les cas comportant des mesures quantitatives, on a seulement mesuré la largeur d'ouverture, qui est caractéristique en premier lieu de l'intensité de la transpiration, et non la longueur des ouvertures stomatiques. Pour obtenir la moyenne de l'état d'ouverture, on a exécuté dix à vingt mesures en calculant la moyenne arithmétique.

Etude des caractères des membranes. — Pour l'étude de la nature chimique des membranes des stomates et de l'épiderme, on s'est servi de réactifs histochimiques (chlorure de zinc iodé, Soudan III).

Dans le but de déterminer des différences chimiques et structurales dans le sujet microscopique, sans modifier son état structural, on s'est servi de la méthode toute moderne de la fluorescence diverse des couches composant les membranes. Dans l'application de cette méthode, on a suivi les prescriptions de HAITINGER (19) et HAITINGER-LINSBAUER (20). On a obtenu en général de bons résultats par la fluorescence propre des substances membranaires. Mais, dans certains cas, on s'est servi aussi de la fluorescence "induite" par des "fluochromes" comme le Thioflavin S et le Primulin. Dans ces expériences, on a utilisé un nouveau type de microscope à fluorescence, fabriqué par REICHERT-Vienne, et des porte-objets spéciaux en verre, perméables aux rayons ultra-violet et dont l'épaisseur ne dépassait pas 1 mm.

Dans le même but de déterminer la localisation de la cutine dans les stomates, on a aussi fait des observations avec le microscope polarisant. Par la différence de couleur d'interférence entre des nicols croisés, on a pu établir sur des préparations d'épidermes les régions à cutine et celles à cellulose.

On a aussi utilisé la double réfraction des mêmes épidermes ou coupes transversales dans les liquides différents, pour étudier les degrés différents de leur gonflement.

On a utilisé l'illuminateur "Opak" LEITZ avec lampe de microscope MIGNON. Les dessins ont été exécutés à l'aide de l'appareil à dessin d'après Abbe, et puis complétés à la main. Les micro-photographies ordinaires ont été tirées au moyen de l'appareil microphotographique de REICHERT d'après Romeis (Kam. S.).

Les photographies de la fluorescence, dont nous ne reproduisons qu'une, ont été faites avec un appareil spécial et des clichés panchromatiques de 4,5/6 cm, en utilisant un objectif apochromatique.

Les expériences discutées dans ce travail ont été conduites du 1^{er} Janvier 1934 jusqu'en Octobre 1937.

I. CRITIQUE DES METHODES DE CONTROLE ET DE LA FAÇON DE LES APPLIQUER

Si l'on veut connaître la valeur d'une méthode quelconque, il faut la comparer à une ou à plusieurs autres. Dans ce travail, la valeur de la méthode de LLOYD (28) va être jugée par sa comparaison avec les modes d'observations suivants: 1°/ examen à sec, à l'aide de l'illuminateur "Opak", 2°/ observation directe de coupes et morceaux de feuilles dans la paraffine à l'aide d'un objectif à immersion, 3°/ observation à sec de coupes d'épiderme entre lame et lamelle, et 4°/ méthode indirecte d'infiltration au moyen des liquides employés par SCHORN (48) et DIETRICH (9).

Avant d'entrer dans l'analyse critique de la méthode de LLOYD, il est indispensable de décider d'abord, jusqu'à quel point on peut se fier aux méthodes de contrôle et quelle est la façon la plus convenable de les appliquer.

a) INFLUENCE DE L'ABLATION DES FEUILLES SUR LES STOMATES.

Puisque, pour la plupart des plantes, on a fait des observations sur des feuilles détachées, il était nécessaire de vérifier d'abord, si la coupe même provoque des changements ou non. En outre, on a dû établir, après combien de temps, depuis l'ablation de la feuille, les stomates subissent des changements, et dans quel sens.

Dans ce but, on a observé à l'aide de l'illuminateur "Opak" ou de l'immersion dans la paraffine, les feuilles sans les détacher de la plante (expériences faites avec *Solanum tuberosum*, *Beta vulgaris*, *Brassica oleracea*). Les pots ont été mis sur la table du laboratoire, à côté du microscope et les feuilles ont été inclinées sur la platine du microscope. — Après avoir mesuré quelques stomates de la feuille, on l'a détachée de la plante et on a noté le temps au bout duquel les stomates ont réagi.

On a constaté que l'action de détacher des feuilles n'a pas changé l'état d'ouverture des stomates et que pour nos objets, il y

avait toujours après le sectionnement, au moins dix minutes pendant lesquelles les ouvertures des stomates ne changeaient pas (observation à sec, à l'aide de l'illuminateur "Opak" et dans l'huile de paraffine) .

Ci-après (Tableau No. I) quelques exemples, prouvant que le fait de détacher les feuilles n'a aucune influence sur les ouvertures des stomates. Comme on le voit d'après ce tableau, on a fait ces observations sur des stomates ouverts ainsi que fermés.

TABLEAU No. I

Influence de l'ablation des feuilles sur la largeur des ouvertures des stomates. Observations faites à l'aide de l'illuminateur "Opak".

E s p è c e	Moyenne de la largeur d'ouvert. des stomates de feuilles rattachées à la plante. en μ	Moyenne de la largeur d'ouvert. des mêmes sto- mates aussitôt après l'ablation. en μ	Les mêmes stomates après 5 minutes. en μ	Les mêmes après 10 minutes en μ
<i>Solanum tuberosum</i>	6.6	6.6	6.6	6.6
"	1.5	1.5	1.5	1.5
"	fermés	fermés	fermés	fermés
<i>Brassica oleracea</i>	5.3	5.3	5.3	5.3
"	fermés	fermés	fermés	fermés
<i>Beta vulgaris</i>	3.9	3.9	3.9	3.9
"	fermés	fermés	fermés	fermés

On a fait les mêmes expériences avec des feuilles coupées au dehors et apportées au laboratoire.

Dans ces expériences, nous avons observé trois à cinq stomates, se trouvant dans le même champ microscopique. Après les avoir mesurés, on éteignait la lumière, pour diminuer le plus possible le temps d'éclairage artificiel. Au point de vue lumière, la feuille se trouvait pendant l'intervalle des mesures dans des conditions sem-

blables à celles du dehors, puisque l'observation se faisait sur la table du laboratoire, devant une fenêtre ouverte et sous les rayons du soleil. Toutes les deux à trois minutes, on a rallumé la lampe de l'illuminateur "Opak" et on a mesuré les stomates. On s'est assuré de cette façon, que pour la plupart de nos objets, il y avait assez de temps pour exécuter les mesures avant que les stomates ne commencent à réagir. Tous les changements qu'on a pu observer étaient dans le sens de la fermeture.

Le tableau (No. II) ci-dessous montre par quelques exemples, pendant combien de temps l'ouverture primitive des stomates persiste. La largeur des ouvertures en μ est la moyenne des ouvertures de plusieurs stomates mesurés.

TABLEAU No. II

Temps pendant lequel persiste l'ouverture des stomates observés à l'illuminateur "Opak".

Espèce	Moyenne de la largeur d'ouverture des stomates en μ	Temps pendant lequel cette largeur persiste
<i>Vinca rosea.</i>	6.3	25 minutes (entre 10h ³⁵ — 11h ⁰⁰)
"	3.9	2 heures (entre 9h ⁰⁰ — 11h ⁰⁰)
<i>Solanum tuberosum.</i>	6.6	15 minutes (entre 8h ²⁵ — 8h ⁴⁰)
<i>Solanum nigrum</i>	6.2	3 minutes (à toute heure de la journée)
<i>Brassica oleracea.</i>	5.3	10 minutes (entre 10h ⁴⁵ — 10h ⁵⁵)
"	1.3	20 minutes (entre 12h ¹⁵ — 12h ³⁵)
<i>Medicago sativa.</i>	7.9	40 minutes (entre 10h ⁴⁰ — 11h ²⁰)
"	4.2	20 minutes (entre 11h ⁴⁰ — 12h ⁰⁰)

En outre, on a pu observer à l'aide de l'illuminateur "Opak" que les stomates des feuilles détachées se fermaient plus vite que les stomates des feuilles, encore rattachées à la plante. Pendant que les stomates de *Medicago sativa*, mesurés lors d'une observation sur une feuille détachée, gardaient leurs ouvertures (de 6,5 μ environ) pendant 40 minutes, ceux d'une feuille rattachée à une branche gardaient ces ouvertures pendant une observation de 65 minutes.

Nous concluons, que les feuilles coupées et observées dans le laboratoire ne commencent à fermer leurs stomates qu'après dix minutes ou plus, ce qui s'accorde avec les observations de STALFELT (57) p. 31, qui a étudié ce problème en détail. Cet auteur a remarqué que les réactions photo-actives d'ouverture sont annulées très lentement. Chez nos objets, le temps nécessaire à la fermeture variait selon les espèces et selon les heures de la journée (voir le Tableau No. II). Elle variait aussi chez la même espèce. Ainsi, nous avons pu établir que vers midi, quand il faisait très clair, la fermeture chez *Vinca rosea* avait lieu, dans le laboratoire, au bout de 40 à 50 minutes, tandis qu'elle s'effectuait en 15 à 20 minutes, le matin, vers 8 heures. Ce fait était connu par STALFELT (55), qui dit: "Il faut donc conclure que la vitesse de la fermeture photo-active est déterminée par la quantité totale de lumière absorbée précédemment. Plus la quantité de lumière sera grande, plus longtemps durera la phase photo-active de la fermeture."

PISEK (42) p. 626, a aussi trouvé que les stomates réagissent parfois très lentement au changement de la lumière. Il mentionne par exemple, qu'à partir du moment où les feuilles furent retirées de l'obscurité jusqu'au moment où les stomates étaient pour la plupart grandement ouverts, il s'est passé chez le *Lupin* un peu plus d'une demi-heure et chez *Coronilla* sp. et d'autres plantes, se trouvant exposées au soleil, plus d'une heure. Il prétend p. 627, que les stomates des feuilles de plantes de sous-bois réagissent plus vite que ceux des plantes croissant dans les terres ensoleillées et sèches. Mme SCHORN (48), p. 801, a aussi pu observer chez *Elatostemma* à l'aide de l'illuminateur "Opak", que le matin, la fermeture avait lieu au bout de 20 minutes et dans l'après-midi déjà au bout de 5 minutes, à cause de la tendance naturelle à la fermeture.

Dans tous les cas, on a fait des observations aussitôt après avoir coupé les feuilles, en supposant que pendant le bref délai nécessaire à l'observation, des changements photo-actifs ou hydro-actifs dus à des variations dans les réserves d'eau n'avaient pas lieu.

b) L'OBSERVATION DIRECTE.

1. L'illuminateur "Opak".

Nous allons maintenant étudier la possibilité d'appliquer les méthodes de contrôle proprement dites, en commençant par celle de l'illuminateur "Opak".

On trouve dans la littérature des opinions différentes sur la valeur d'observation des stomates au moyen de l'illuminateur "Opak".

Mme SCHORN (48) p. 801 prétend, que la chaleur et la sécheresse, dues à un fort éclairage artificiel, produisent un changement dans les ouvertures stomatiques. Tous ceux qu'elle a pu observer par suite de l'usage de l'illuminateur, étaient dans le sens de la fermeture. Mais ces réactions s'observaient seulement chez des plants particulièrement sensibles. Chez d'autres, elle a pu établir que, pendant les 10 minutes dont elle a eu besoin pour exécuter les mesures, les stomates ne se sont pas fermés.

Pour s'assurer si les feuilles souffrent en effet de la lumière ou de la sécheresse et si, pour cette raison, elles ferment leurs stomates plus vite qu'elles ne l'auraient fait sous l'influence de l'éclairage naturel, on a tenu sur la table une autre feuille coupée, comme témoin. Après environ dix minutes d'observation de la première avec l'illuminateur (la lampe ne s'allumait qu'au moment des mesures), on a comparé l'état d'ouverture de ses stomates sous le microscope, à celui de la feuille témoin. Il n'y avait pas de différences notables.

Le tableau (No. III) ci-dessous montre la largeur d'ouverture des stomates dans ces expériences.

TABLEAU No. III.

Largeur des stomates de feuilles observées aussitôt après leur détachement et puis pendant 10 minutes de leur séjour sur la platine du microscope, comparés à ceux de feuilles se trouvant pendant 10 minutes sur la table du laboratoire, dans les mêmes conditions d'éclairage.

Espèce	Feuilles sous le microscope en μ	Feuilles témoins sur la table en μ
<i>Vinca rosea</i>	6.7	6.2
<i>Solanum tuberosum</i>	4.1	4.7
<i>Plantago Lagopus</i>	3.9	4.4
<i>Dodonaea viscosa.</i>	5.3	4.9
<i>Medicago sativa</i>	7.9	6.6

On voit que les différences entre les ouvertures observées à l'illuminateur aussitôt après l'ablation de la feuille et celles de la feuille témoin sont irrégulières et (sauf chez *Medicago*), proches des limites d'erreur d'observation. Dans ces expériences, il y avait un temps d'au moins dix minutes, pendant lequel les stomates des feuilles coupées persistaient dans leur état d'ouverture initial.

Dans nos expériences, nous avons comparé l'influence sur les stomates d'une illumination continue pendant un temps donné au moyen de la lampe de l'illuminateur, à celle d'une illumination provoquée uniquement au moment des mesures. Les résultats montrent, qu'il n'y avait pas de différence dans l'action de ces deux traitements. Ce résultat se confirme pour *Vinca rosea* (durée de l'expérience 30 minutes, observation faite à 9 h. du matin, ouverture des stomates dans les deux cas: $7,9 \mu$ environ) et *Medicago sativa* (durée de l'expérience 15 minutes, observation faite à 9.30 h. du matin, ouverture des stomates dans les deux cas $6,6 \mu$ environ). Chez *Solanum nigrum* au contraire, les stomates dans la lumière continue, aussi bien que dans la lumière produite seulement pour les mesures, ne conservaient la largeur initiale de leur ouverture ($5,3 \mu$) que pendant 5 minutes.

Il résulte de nos observations: 1) que la lumière de l'illuminateur "Opak" ne provoque pas de changements dans l'ouverture des stomates, puisque la même ouverture persiste, que la lumière artificielle soit beaucoup ou peu utilisée, 2) que le délai pendant lequel la largeur d'ouverture des stomates des feuilles coupées persiste, diffère selon les espèces et les conditions d'illumination précédant l'expérience.

2. L'immersion dans l'huile de paraffine.

Au sujet de la méthode d'observation directe dans l'huile de paraffine, nous sommes d'accord avec STALFELT (57), qui constate, p. 28, qu'il n'y a pas de changement rapide dans les largeurs d'ouverture des stomates comme conséquence de l'application de l'huile de paraffine (ni même de l'éclairage intensif, ce qui s'accorde avec ce qui précède) et en opposition avec NIUS (36), p. 43, qui craint le contraire. Nous avons pu confirmer ces conclusions pour tous les objets étudiés par nous. D'après STALFELT, il faut toujours tenir compte pendant les mesures des petites pulsations de turgescence qui,

pourtant, ne sont pas augmentées par l'éclairage et l'usage de l'huile de paraffine.

Nous avons comparé les résultats d'observations dans la paraffine aux mesures, obtenues à sec, à l'aide de l'illuminateur "Opak". On s'est servi d'abord de l'illuminateur. Puis, on a observé les mêmes endroits, qu'on a le plus souvent retrouvés, sous la paraffine. Les mesures obtenues concordaient. Pour pouvoir appliquer ces deux modes d'observation sur un même endroit on a choisi sur la feuille une portion limitée par deux nervures, sans toutefois la marquer de taches d'encre ni de piqûres, pour ne pas irriter le tissu et ne pas causer de changements dans l'état des stomates.

Le tableau suivant montre quelques mesures de ce genre.

TABLEAU No. IV.

Comparaison entre les largeurs des stomates obtenues à sec avec l'illuminateur "Opak" et celles, obtenues dans la paraffine.

Espèce	Moyenne des largeurs des stomates observés avec l'illuminateur "Opak" en μ	Moyenne des largeurs des stomates observés dans la paraffine en μ
<i>Medicago sativa.</i>	7.5	9.1
<i>Solanum nigrum.</i>	7.2	6.1
<i>Plantago Lagopus.</i>	4.1	4.8
<i>Vinca rosea.</i>	6.6	7.9
<i>Dodonaea viscosa.</i>	4.1	3.5
<i>Albersia Blitum.</i>	2.6	2.2

Nous avons effectué la mesure des stomates dans la paraffine de deux façons: 1°/ on a pris une feuille entière ou une grande partie de feuille en mettant une goutte de paraffine sur un endroit et en observant à l'aide d'un objectif à immersion. De cette façon, la paraffine n'a pas pu pénétrer dans les espaces intercellulaires périphériques ouverts par la coupe. 2°/ on a coupé (comme STALFELT le fait le plus souvent), une "fenêtre" de 0,5 cm², et on l'a recouverte entièrement de paraffine, de sorte que celle-ci pouvait infiltrer le morceau de feuille par l'intermédiaire du tissu lacuneux.

Ces deux méthodes ne donnaient pas de résultats tout à fait identiques. Dans les feuilles à stomates ouverts, la fermeture avait lieu après plus de temps dans le cas de feuilles entières ou de grands morceaux que dans celui de petits morceaux (fenêtres), recouverts complètement de paraffine. Ainsi, dans une feuille intacte de *Medicago sativa*, les stomates restèrent ouverts de $7,8 \mu$ dans la paraffine pendant 45 minutes, tandis que dans une "fenêtre" de $0,5 \text{ cm}^2$, recouverte de paraffine, le rétrécissement des stomates ouverts à un degré semblable, avait déjà lieu après 15 minutes. Les stomates du *Dodonaea viscosa* restèrent ouverts pendant 25 minutes dans le cas d'une feuille entière, tandis que dans une "fenêtre", observée dans les mêmes conditions, les stomates se fermèrent déjà après 10 minutes. A en juger par ces résultats, l'utilisation de la paraffine ne pouvait pas fausser le résultat de nos mesures, même dans les petits morceaux, puisque la mesure nous prenait au plus dix minutes. *Calendula officinalis*, *Plantago Lagopus*, *Vinca rosea* et d'autres, gardaient même de grandes ouvertures pendant un temps variant de 20 à 60 minutes, et quelquefois davantage. *Portulaca oleracea* et *Solanum nigrum* seulement forment des exceptions à cette règle, comme on le voit d'après le tableau No. V. Leurs stomates se fermaient assez vite dans l'huile de paraffine et il fallait en tenir compte.

TABLEAU No. V.

Le temps nécessaire à la fermeture des stomates dans la paraffine.

Espèce	Moyenne des ouverts, des stomates au commencement des mesures en μ	après 3' en μ	après 5' en μ	après 7' en μ	après 10' en μ	après 15' en μ	après 20' en μ
<i>Portulaca oleracea</i>	12	12	5	3			fentes
"	7.9	7.2	6.6	5.2	3.5		fentes et fermés.
<i>Solanum nigrum</i>	10.6	10	7.9		3.7	fentes ou fermés	
"	6.2	6.2	3.5	3.5	2.6	fermés	

On a pu observer que les stomates de ces mêmes plantes, ouverts à un très haut degré, se rétrécissent plus vite dans la paraffine que ceux, ouverts à un degré moyen ou petit.

Pour établir si les stomates se comportent dans la paraffine de la même façon qu'à l'air, on a adopté une méthode analogue à celle, décrite plus haut : on a observé une partie d'une feuille dans la paraffine, en laissant une autre sur la table, comme témoin. Dix minutes environ après la première observation dans la paraffine, on a observé le morceau témoin, également dans la paraffine; les deux mesures concordaient à peu près. Chez une feuille de *Vinca rosea*, enduite de paraffine et observée sitôt après l'ablation de la feuille, on a constaté une largeur moyenne des stomates de $6,6 \mu$. La mesure moyenne du morceau témoin, qui se trouvait pendant 15 minutes à l'air, sur la table du laboratoire, était de $6,1 \mu$.

Dans toutes nos mesures exécutées avec des feuilles d'espèces différentes, nous avons pu établir que les grandeurs d'ouvertures mesurées à sec avec l'illuminateur "Opak" correspondaient toujours assez bien à celles qu'on mesurait dans l'huile de paraffine. (Tableau No. IV). La valeur des mesures obtenues par la méthode de LLOYD, a donc été jugée par la comparaison avec ces deux méthodes.

3. L'observation des coupes à sec.

Dans beaucoup de cas, la méthode de LLOYD a été aussi comparée à l'observation des coupes à sec, en utilisant, comme en microscopie ordinaire, l'éclairage en lumière transmise, méthode qui s'est montrée très utile, comme on le verra dans la suite de ce travail.

c) METHODE INDIRECTE: L'INFILTRATION.

Toutes les méthodes précédentes montraient d'autre part une certaine concordance avec le degré d'infiltration par les liquides des séries de Mme SCHORN (48) et DIETRICH (9). Pour la pénétration de chaque liquide de la série de DIETRICH on a adopté la notation de PISEK et CARTELLIERI (43), p. 205; 1—2—3 points isolés jusqu'à beaucoup de points isolés, I, II, III, points apparaissant lentement jusqu'à très vite. (Lentement veut dire au plus $\frac{1}{2}$ minute). Pour les grandes taches qui apparaissent très vite, le signe utilisé est $\triangle$.

Toutefois, nous avons observé qu'un degré d'infiltration moyen correspondait toujours à un degré

d'ouverture petit. Ainsi par exemple, dans le tableau No. VII (dernière ligne) chez *Dodonaea viscosa*, un degré d'infiltration moyen (xylol et pétrole II₂; huile de térébenthine + huile de ricin I₁.) correspond à un petit état d'ouverture, c'est à dire à l'ouverture s'approchant d'un μ , ou aux fentes ou même aux stomates fermés. Dans le tableau No. VIII, chez *Plantago Lagopus* (deuxième ligne), un degré d'infiltration moyen (xylol III₁; pétrole II₁; huile de térébenthine + huile de ricin I₁) ne correspond pas à un degré d'ouverture moyen, mais en réalité à un état d'ouverture très petit, de 1 à 2 μ . Il n'y a que le degré d'infiltration très grand qui corresponde à un degré d'ouverture considérable, comme on le voit d'après les exemples du tableau No. VII pour *Dodonaea viscosa*, et dans le tableau No. VIII pour *Vinca rosea* et *Medicago sativa*.

On a aussi constaté qu'un même état d'infiltration correspondait chez une même plante à des ouvertures différentes. Par exemple, dans le tableau No. VIII, chez *Rosa* "Dorothy Perkins", le même état d'infiltration correspond à des ouvertures de 4,1 μ et de 2,3 μ . Dans le tableau No. VIII, chez *Solanum nigrum*, on voit aussi, qu'un très grand degré d'infiltration correspond, dans deux cas, à des états d'ouverture variés.

La méthode d'infiltration ne nous a donc renseigné qu'approximativement sur l'état d'ouverture. Nous n'avons pas tiré de conséquences des observations faites par cette méthode, puisque les résultats correspondaient plus ou moins aux mesures obtenues à l'aide des méthodes d'observation directe. Cette méthode indirecte nous a seulement aidé à juger grossièrement de l'état d'ouverture.

L'amphistomatie des feuilles joue peut-être un certain rôle dans le degré d'infiltration. La plupart de nos objets sont des types amphistomatiques (*Solanum nigrum*, *Solanum tuberosum*, *Brassica oleracea*, *Vinca rosea*, *Medicago sativa*, et autres). LEICK (27), p. 29, prétend que "la pénétration des liquides d'infiltration sur un côté de la feuille dépend beaucoup du degré d'ouverture des stomates du côté inverse." Toutes nos observations des stomates se faisaient toujours sur la face inférieure des feuilles.

Avec ces remarques, nous terminons la discussion des méthodes auxquelles on a comparé la méthode de LLOYD et de la façon de les appliquer.

II. DANS QUELS CAS LA METHODE DE LLOYD EST-ELLE APPLICABLE?

a) CLASSIFICATION DES FEUILLES SUIVANT LEUR ANATOMIE.

Par nos examens à l'aide des méthodes de contrôle citées, nous avons pu établir qu'il y a certaines plantes auxquelles la méthode de LLOYD n'est pas applicable et chez lesquelles on trouve toujours les stomates fermés dans l'alcool, bien qu'à l'aide des autres méthodes, on constate qu'ils sont ouverts. Les espèces observées par nous et auxquelles la méthode de LLOYD s'est montrée inapplicable, sont: *Citrus sinensis*, *Ceratonia Siliqua*, *Ficus nitida*, *Eucalyptus rostrata*, *Pittosporum Tobira*. Par exemple, des épidermes de *Citrus sinensis*, plongés dans l'alcool, ont montré les stomates fermés, alors qu'à l'état naturel ils sont ouverts, comme on l'a vu par l'application des méthodes d'infiltration ou à la paraffine (voir tableau No. VI). Par contre, on a constaté, qu'il y a d'autres plantes chez lesquelles le degré d'ouverture, mesuré à l'aide de la méthode de LLOYD, correspond presque exactement à celui qui est déterminé avec les méthodes de comparaison. Ainsi par exemple, des épidermes de *Pisum sativum* (sans mésophylle) possèdent pratiquement les mêmes ouvertures dans l'alcool (5.3μ), dans la paraffine (6.3μ), sous l'illuminateur "Opak" (5.9μ) et correspondent à de grands degrés d'infiltration. Voici la liste des plantes, étudiées par nous, auxquelles on a appliqué la méthode de LLOYD avec succès: *Pisum sativum*, *Beta vulgaris*, *Brassica oleracea*, *Solanum tuberosum*, *Solanum nigrum*, *Calendula officinalis*, *Plantago Lagopus*, *Vinca rosea*, *Medicago sativa*, *Albersia Blitum*, *Chenopodium murale*, *Amaranthus retroflexus*.

On a pu constater d'autre part, que les stomates de *Dodonaea viscosa* et *Rosa* sp. représentent des types de passage entre les deux groupes précédents. Lorsque les stomates de ces feuilles, observés à sec, à l'aide de l'illuminateur "Opak" ou dans l'huile de paraffine, étaient largement ouverts, ceux que l'on observait dans l'alcool, avaient des ouvertures beaucoup plus étroites. Lorsque nous avons constaté à l'aide de ces méthodes de comparaison des ouvertures très étroites, nous avons trouvé dans le morceau plongé dans l'alcool, des stomates très peu ouverts ou complètement fermés (voir tableau No. VII).

On a essayé de voir s'il y a quelques relations entre l'anatomie des feuilles et les différences dans le comportement des stomates envers l'alcool. En divisant les feuilles en deux groupes, 1°/ l'un auquel on peut appliquer la méthode de LLOYD, 2°/ l'autre, auquel on ne peut pas l'appliquer, on a trouvé que ces deux groupes, tout en ayant un comportement différent envers l'alcool, sont caractérisés également par une adhérence plus ou moins grande de l'épiderme au mésophylle. Les genres auxquels on ne peut pas appliquer la méthode de LLOYD, possèdent des feuilles à épiderme fortement adhérent au mésophylle, c.à.d. non détachable par arrachement, tandis que les types de feuilles auxquelles on peut bien appliquer la méthode de LLOYD, possèdent des épidermes facilement détachables par arrachement. Cette observation est nouvelle. LLOYD, dans sa publication de 1908, ne mentionne aucune influence de la structure de la feuille, telle que l'adhérence du mésophylle à l'épiderme etc.) sur la possibilité d'appliquer sa méthode.)* Il n'y a que chez SOLOVSKY-IRTEL V. BRENDORF (52), p. 13 qu'on trouve une énumération des conditions auxquelles la plante doit répondre, pour se prêter à la méthode de LLOYD. L'une d'elles, (no. 4) est: "un épiderme détachable par arrachement." Malheureusement cette indication est donnée accidentellement, sans que le mémoire énonce aucun fait permettant cette conclusion.

Les épidermes de *Dodonaea viscosa* et *Rosa* sp., dont le comportement envers la méthode de LLOYD donne des résultats intermédiaires entre les deux groupes précédents, représentent également, au point de vue de l'adhérence de l'épiderme, des types de passage entre les deux groupes de feuilles mentionnés ci-dessus.

1. Groupe I à épiderme adhérent.

On s'est demandé pourquoi les épidermes non détachables par arrachement et pour cela forcément coupés avec un peu de mésophylle, avaient toujours les stomates fermés dans l'alcool, malgré qu'on ait souvent constaté, à l'aide des méthodes de contrôle (illuminateur, paraffine, infiltration), qu'ils étaient ouverts *in situ*. Pour résoudre ce problème, nous avons cherché à voir tout d'abord, si

*) Un cas spécial, qui sera étudié à part, est celui de *Portulaca oleracea*, auquel la méthode de LLOYD ne s'applique pas, bien que cette plante possède un épiderme facilement détachable par arrachement.

la fermeture des stomates a déjà lieu au moment de la coupe de l'épiderme ou seulement de la fixation.

Dans ce but, on a fait des coupes d'épidermes de ce type et on les a aussitôt observées à sec (illuminées par dessous), entre lame et lamelle. Chez *Ficus nitida* et *Eucalyptus rostrata*, on a établi que la coupe ne causait pas la fermeture des stomates et que leurs ouvertures correspondaient ainsi aux résultats de la méthode d'infiltration, appliquée aux feuilles intactes. Dans le cas d'une infiltration nulle ou faible, on a constaté sur des épidermes observés à sec, que les stomates étaient fermés, tandis que pour un haut degré d'infiltration (comme on le voit dans le tableau No. VI), on a trouvé les stomates largement ouverts. (Cet état ne persistait du reste que de 2 à 4 minutes, puis, les stomates se sont fermés; il est probable, que la déshydratation y a joué un certain rôle). L'usage de l'immersion dans la paraffine et de l'illuminateur "Opak" ne permettait pas toujours, dans le cas de ces espèces sauf chez des feuilles jeunes et pas trop épaisses, d'établir le degré d'ouverture.

Les stomates de *Ficus* et *Eucalyptus*, ouverts*) à sec, se fermaient dans l'alcool, excepté les stomates périphériques des coupes, qui restaient ouverts. Ces stomates périphériques observés précédemment à sec étaient beaucoup plus largement ouverts que ceux du centre. (On n'a jamais pu observer de différences aussi considérables entre les stomates centraux et périphériques de coupes de feuilles à épiderme facilement détachable par arrachement). Les causes de la fermeture des stomates dans l'alcool seront étudiées par la suite.

Le fait que les stomates, ouverts *in situ* et dans les coupes pendant leur observation à sec, se ferment après le transfert dans l'alcool, prouve, quelle que soit l'interprétation de ce fait, qu'on ne peut pas appliquer la méthode de LLOYD à ces plantes.

On n'a jamais trouvé de stomates ouverts sur les coupes d'épidermes observées à sec chez d'autres objets à épiderme adhérent tels que *Citrus sinensis*, *Ceratonia Siliqua* et *Pittosporum Tobira*. Pour se rendre compte de l'état des stomates in-situ, la nature des

*) Les stomates de *Ficus* et *Eucalyptus* fermés sur les coupes d'épiderme observées à sec, restaient fermés après leur transfert dans l'alcool.

feuilles de ces plantes n'a permis l'utilisation que de la méthode d'infiltration, sauf dans le cas de jeunes feuilles de *Citrus* pour lesquelles on a aussi pu employer la méthode à la paraffine.

Il est difficile de se rendre compte uniquement d'après l'infiltration, si ces stomates étaient largement ouverts *in situ*. Pour le *Citrus*, même dans le cas d'une très grande infiltration*) (liquide de SCHORN No. 4 pénétrant, pétrole I, xylol I, huile de térébenthine + huile de ricin I₁) et lorsque l'observation dans la paraffine a montré les stomates ouverts de 3 à 4 μ , les coupes d'épidermes observées à sec avaient les stomates fermés. On doit donc supposer que la fermeture s'effectue ici *pendant la coupe*.

Dans les cas de *Ceratonia* et *Pittosporum*, on n'a jamais pu constater un haut degré d'infiltration. Le plus grand constaté était : liquide de SCHORN 3 pénétrant, pétrole III, xylol II, huile de térébenthine + huile de ricin 0, paraffine 0. A en juger d'après l'état d'infiltration, il semble que l'amplitude des mouvements des stomates de ces deux genres soit toujours petite et que des ouvertures très grandes ne s'y produisent jamais. SCHWENDENER (50) a déjà observé que les mouvements stomataires chez les feuilles persistantes sont minimes, grâce à leur structure, comprenant cuticule épaisse et lumens étroits. Malheureusement, il est encore plus difficile de juger de l'état naturel *in situ* chez ces deux plantes que chez l'Oranger. Il est aussi possible que dans ces cas, la fermeture ait également lieu pendant la coupe.

Quelle que soit l'explication correcte de ces phénomènes on ne peut pas appliquer la méthode de LLOYD aux feuilles à épiderme adhérent. On voit donc que les stomates de ce groupe à épiderme adhérent se ferment soit pendant la fixation dans l'alcool (*Ficus nitida* et *Eucalyptus rostrata*) soit déjà pendant l'exécution de la coupe (*Citrus sinensis* et probablement *Ceratonia Siliqua* et *Pittosporum Tobira*).

*) Il a été démontré par OPPENHEIMER et MENDEL (40) que cette méthode convient au *Citrus*.

TABLEAU No. VI.

Comparaison des moyennes d'ouvertures des stomates de types à épiderme fortement adhérent au mésophylle.

Espèce	A sec aussitôt après la coupe	Dans l'alcool	Dans la paraffine	Infiltration				
				xylol	pétrole	huile de térébenthine + huile de ricin	paraffine	liquides de SCHORN
<i>Ficus nitida</i> .	6 μ	fentes, fermés		$\triangle$	$\triangle$	II ₂	I ₁	7+
"	fermés	fermés		I ₁	0	0	0	1+
<i>Eucalyptus rostrata</i>	12 μ	la plupart fermés périphériques ouverts	10 μ	$\triangle$	$\triangle$	III ₃	II ₁	8+
"	fentes, fermés			II ₁	II ₁	0	0	2+
<i>Citrus sinensis</i>	fermés	fermés	3 à 4 μ	$\triangle$	$\triangle$	I ₁	0	5+
"	fermés	fermés		I ₁	II ₁	0	0	1+
<i>Pittosporum Tobira</i>	fermés	fermés		II ₁	0	0	0	3+
<i>Ceratonia Siliqua</i>	fermés	fermés		I ₁	I ₁	0	0	1+

2. Groupe II de transition.

Les feuilles de *Dodonaea viscosa* et *Rosa* "Dorothy Perkins" représentent des types de passage entre le groupe à épiderme fortement adhérent au mésophylle et le groupe à épiderme facilement détachable qui sera étudié par la suite. L'adhérence de leurs épidermes est suffisante pour empêcher qu'on les arrache facilement. Il faut donc les détacher en les coupant, d'où il résulte qu'il y a toujours un peu de mésophylle au centre des coupes. Cependant, on peut enlever des zones marginales sans mésophylle en combinant coupe et arrachement. Dans le cas où, à l'aide de l'illuminateur ou bien par l'immersion dans la paraffine, nous déterminions que les stomates étaient largement ouverts, les morceaux d'épiderme de ces mêmes feuilles

observés dans l'alcool avaient les ouvertures beaucoup plus étroites. Et quand, à l'aide de l'illuminateur et dans la paraffine, nous trouvions des ouvertures très étroites, on constatait dans le morceau d'épiderme plongé dans l'alcool, des stomates à ouverture faible ou complètement fermés. La fixation dans l'alcool montre donc les stomates moins ouverts qu'ils ne le sont *in vivo*, à en juger par toutes les méthodes de comparaison.

Sur des coupes tangentielles de ces feuilles, observées dans l'alcool, on voit très nettement que les stomates sont ouverts beaucoup plus largement aux endroits où il y a peu de mésophylle qu'aux endroits où il y en a davantage (tableau No. VII). Autrement dit: dans l'alcool les ouvertures des stomates des endroits à minimum de mésophylle correspondent relativement mieux à l'état naturel, à en juger par les mesures faites avec l'illuminatur ou bien à l'aide de l'immersion dans l'huile de paraffine. Mais comme on l'indique au tableau No. VII, elles sont tout de même plus petites que les mesures obtenues à l'aide des méthodes de comparaison.

Chez ces mêmes plantes on a aussi étudié des coupes d'épiderme à sec, entre lame et lamelle. On a pu constater que ces coupes, qu'elles possèdent beaucoup ou peu de mésophylle, avaient les stomates fermés ou ouverts au même degré que les stomates observés *in situ*, et ceci quelle que soit l'épaisseur du mésophylle (Tableau No. VII).

En ajoutant ensuite de l'alcool, on a pu s'assurer que le rétrécissement est produit par ce liquide.

Les mesures prises sur les stomates aux endroits à épiderme sans mésophylle correspondaient presque à l'état d'ouverture mesuré par les autres méthodes. On le constatait surtout chez *Dodonaea viscosa*, où l'épiderme est relativement moins adhérent au tissu du mésophylle et ce dernier est beaucoup plus lâche que chez *Rosa* sp. Pour ces plantes, surtout pour *Dodonaea viscosa*, l'observation à sec est plus à conseiller, car, dans ce cas, les ouvertures stomatiques se rapprochent plus de l'état naturel que dans le cas d'observation dans l'alcool.

TABEAU No. VI.
 Comparaison des moyennes d'ouvertures des stomates chez les feuilles
 de *Rosa* "Dorothy Perkins" et *Dodonaea viscosa*.

E s p è c e	Coupes à sec		Coupes dans l'alcool		Morceaux de feuilles dans paraffine	Morceaux de feuilles (illumina- teur "Opak")	I n f i l t r a t i o n				Liquides de SCHORN
	peu de mésophyle	plus de mésophyle	avec peu de mésophyle	avec plus de mésophyle			xylol	pétrole	h. de téré + h. de ric.	paraffine	
Rosa "Dorothy Perkins",	4.1 μ état d'ouverture varié	2.1 μ état d'ou- verture varié	1.5 μ fentes	4.8 μ	5.1 μ	III ₃	III ₂	I ₂	0	3 +	
"	2.3 μ quelques fentes.	1.5 μ fentes, état varié	3.5 μ fentes, fermés	3.5 μ qq. fentes.	3.5 μ qq. fentes.	III ₃	III ₃	I ₂	0	3 +	
Dodonaea viscosa	6.6 μ	4.8 μ	2.3 μ	6.8 μ	6.6 μ	1	III ₂	I ₁	0	4 +	
"	5.1 μ	4.6 μ	2.2 μ	5.7 μ	5.5 μ	1	III ₁	I ₁	0		
"	fermés	fermés qq. fentes.	fermés	fermés qq.—uns 1.3 μ	fermés qq. fentes.	II ₂	II ₂	I ₁	0		

Ajoutons que pendant l'observation à sec, on a pu se convaincre que les stomates situés aux endroits où l'épiderme était complètement ou presque dépourvu de mésophylle, se fermaient très vite (après deux minutes environ), tandis que ceux des endroits, où il y avait plus de mésophylle, restaient ouverts, pendant l'observation à sec, de 5 à 7 minutes.

Résumons: dans le deuxième groupe, les portions d'épidermes avec relativement beaucoup de mésophylle, se rapprochent, par leur comportement dans l'alcool, plutôt du premier groupe, possédant les épidermes fortement adhérents, tandis que les parties sans mésophylle se rapprochent plutôt du groupe à épidermes facilement détachables.

3. Groupe III à épiderme détachable.

Comme on le voit dans le tableau No. VIII, les épidermes du type facilement détachable par arrachement ont toujours montré dans l'alcool les ouvertures des stomates correspondant relativement bien à celles, obtenues à l'aide des autres méthodes de comparaison*).

Il semble que chez le type à épiderme facilement détachable, l'arrachement de celui-ci ne produit pas, même d'une façon transitoire, de changements dans le degré d'ouverture des stomates, puisqu'on trouve à peu près le même degré d'ouverture dans l'alcool et avant la fixation. Mais pour s'assurer que dans ce cas, la coupe même ne provoque pas de changement — qui pourrait se corriger sous l'influence de l'alcool — on a examiné les coupes d'épiderme sans mésophylle, entre lame et lamelle, à sec, tout de suite après l'opération. On a pu constater de cette façon chez *Vinca rosea*, *Medicago sativa*, *Solanum nigrum* et autres, que lorsqu'on trouvait à l'illuminateur et à l'immersion appliquée aux feuilles intactes, les stomates ouverts, les épidermes sans mésophylle, observés à sec entre lame et lamelle, possédaient également des ouvertures du même ordre. De même, lorsque avec les méthodes de comparaison, on trouvait les stomates fermés, les stomates des épidermes sans mésophylle et observés à sec étaient également fermés. Le degré d'ouverture persistait pendant un certain temps, ce qui suffisait à l'exécution des mesures.

*) On a pu observer que chez ces types, la facilité de l'arrachement de l'épiderme dépend de la turgescence des feuilles. On a constaté chez *Albersia Blitum* et *Medicago sativa*, que si les feuilles sont bien turgescents, l'enlèvement de l'épiderme est beaucoup plus facile que dans le cas où elles sont peu turgescents.

TABLEAU No. VIII.

Mesures moyennes d'ouverture des stomates d'épidermes avec et sans mésophylle dans l'alcool et comparaison avec celles des autres méthodes

Espèce	Moy. de larg. d'ouv. des stomates observés dans l'alcool		Moy. d'ouv. des stomates observés à l'aide de l'illuminateur "Opak" en μ	Moy. d'ouv. des stomates observés à l'immersion ds. la paraffine. en μ	Infiltration		
	épiderme avec mès. en μ	épiderme sans mès. en μ			xylol pétrole	H. de tér. + H. de ric.	Liquides de paraf. fine SCHORN
<i>Pisum sativum</i>	1.7	5.3	5.9	6.3	$\triangle$	I	I V +
<i>Vinca rosea</i>	1.5 qq. fentes	4.6	5.5	5.7	$\triangle$	0	IV +
"	stom. fermés	2.6	2.8	2.4	III ₁ II ₂	0	II +
<i>Plantago Lagopus</i>	2.0 état d'ouv. varié	5.5		6.4	$\triangle$	II ₁	I ₁ IV +
"	0.9 fentes	1.3	2.0	2.1	III ₁ II ₁	I ₁	+
<i>Medicago sativa</i>	2.5 (et fentes)	6.5			$\triangle$	I ₁	+
"	fentes, stom. fermés	2.3	3.1	3.3	III ₁ II ₁	0	0 III +
<i>Solanum nigrum</i>	4.1	6.2	7.4	8.1	$\triangle_2$	I ₁	I ₁ IV +
"	3.4	4.0	4.3	4.1	$\triangle_1$	I ₁	I ₁
<i>Albersia Blitum</i>	1.3	2.6	4.7	5.2	III ₄ III ₃	0	0 III +

(L'indication "fentes" signifie que les ouvertures des stomates étaient plus étroites que I μ).

Après l'observation à sec, on a ajouté de l'alcool à ces mêmes coupes se trouvant entre lame et lamelle, et on a pris de nouvelles mesures. On a alors pu observer un léger rétrécissement de la largeur des ouvertures des stomates.

Pour des recherches sur la transpiration et l'assimilation, il importe peu que dans le cas de grandes ouvertures à l'étal naturel, les mesures soient un peu moindres qu'en réalité. Comme on le sait, des fluctuations d'ouverture influencent peu dans ce cas l'échange gazeux. Au contraire, dans le cas d'ouvertures très petites, le rétrécissement des stomates dans l'alcool peut provoquer des erreurs considérables dans l'évaluation des échanges gazeux, comme cela a été établi par HUBER (23) et STALFELT (57).

Chez *Portulaca oleracea*, les ouvertures des stomates après la fixation dans l'alcool ne correspondaient pas à celles qui étaient mesurées par les méthodes de contrôle. Il y avait toujours des modifications dans l'alcool: le plus souvent, dans ce liquide, les stomates étaient plus fermés que ceux, observés — avant l'arrachement — avec l'Opak et par l'immersion. Quelquefois, ils étaient ouverts comme ceux observés par les méthodes de comparaison et même davantage. Dans les mêmes coupes, on a trouvé souvent un comportement très irrégulier des stomates, dont certains étaient très largement ouverts et d'autres fermés, ou se présentaient avec de petites ouvertures.

L'explication, à notre avis, est à rechercher dans les blessures causées à l'épiderme de cette plante, qui est extrêmement tendre, par l'arrachement. On comprend facilement que pendant le rapide dessèchement d'un tel épiderme, des distorsions presque inévitables peuvent se produire, d'où variations dans l'état d'ouverture des stomates. Cet épiderme s'enlève facilement, mais cependant, il ne reste pas tendu comme chez d'autres plantes; au contraire il se plisse. Nous avons établi qu'on trouve dans l'épiderme détaché beaucoup d'endroits où les stomates manquent; ce fait indiquerait que ces organes sont souvent endommagés pendant l'arrachement. Dans notre photographie No. I, on voit très nettement les cellules annexes et des trous à la place des stomates. Une partie considérable des stomates manque souvent: ils restent attachés au mésophylle.

Le fait qu'il y a des cas exceptionnels où l'épiderme est endommagé pendant l'arrachement, était connu par LLOYD (28), qui l'a constaté chez *Chrysoma pauciflosculosa*. Il le considère comme une

exception, puisque cette plante a une anatomie toute spéciale, qui expliquerait ce fait. Notre cas de *Portulaca cleracea* est aussi un peu spécial; les feuilles sont assez épaisses, le mésophylle est très lâche et contient beaucoup d'eau. L'anatomie de l'épiderme de cette plante présente aussi des caractères spéciaux: autour des cellules de fermeture, il y a deux cellules annexes leur ressemblant. Outre ces deux cellules, il y a encore deux cellules périphériques plus grandes, qui forment un deuxième cercle autour des stomates. Ce sont probablement ces caractères anatomiques qui permettent aux stomates de se détacher de l'épiderme pendant son arrachement.

Nous nous sommes demandé quelle était l'influence du mésophylle sur les ouvertures des stomates lors de l'application de la méthode de LLOYD aux feuilles de ce troisième groupe. Cela nous semblait important pour en tirer des conclusions quant à l'influence du mésophylle sur l'état des épidermes en général. Comme on le voit au tableau No. VIII, les ouvertures des stomates dans l'alcool étaient beaucoup plus petites sur les portions d'épiderme avec mésophylle que sur celles détachées de la même feuille sans mésophylle. On a également observé cette différence sur une même coupe, dont une partie comprenait du mésophylle et l'autre en était dépourvue. Cette influence du tissu mésenchymatique se retrouvait sur tous les sujets du troisième groupe étudiés par nous. Mais la différence des ouvertures n'était pas la même chez toutes les espèces. Par exemple, chez *Pisum sativum* (tableau No. VIII), on a mesuré dans l'alcool une ouverture moyenne des stomates de 5.3μ dans un épiderme sans mésophylle et 1.7μ dans un épiderme avec mésophylle. Chez *Solanum nigrum*, la différence entre les largeurs d'ouverture des stomates avec et sans mésophylle n'était pas toujours aussi considérable (sans mésophylle 6.2μ ; avec mésophylle 4.1μ).

Il est à noter que chez les plantes du troisième groupe, on n'a pas observé une différence bien considérable dans l'état d'ouverture des stomates entre la zone périphérique de la coupe et la partie centrale.

On a souvent pu observer sur une même coupe des différences d'ouvertures en rapport avec la quantité de mésophylle: les stomates des endroits pauvres en mésophylle étaient plus ouverts dans l'alcool que ceux qui en étaient bien pourvus. Puis, l'influence du mésophylle ne dépend pas seulement de sa quantité (épaisseur), mais

aussi de sa structure plus ou moins lâche. S'il est relativement lâche, comme chez *Solanum nigrum* par exemple, son influence sur la fermeture des stomates paraît être plus faible que chez *Vinca rosea*, où le mésophylle est plus serré et provoquerait un plus grand rétrécissement des stomates.

Il y a peu d'auteurs parmi ceux qui ont utilisé la méthode de fixation dans l'alcool, qui indiquent dans leurs publications, s'ils ont fait des coupes d'épidermes avec ou sans mésophylle. Il semble donc qu'ils n'ont pas accordé à cette question une attention suffisante. On a trouvé tout de même dans la littérature certaines indications sur le mode d'exécution des coupes. LLOYD (28), p. 28 et LOFTFIELD (29) ont utilisé des épidermes détachés sans mésophylle. RENNER (46), p. 492 prétend, qu'à cause des blessures (souvent invisibles) des cellules annexes, toujours produites à son avis pendant l'enlèvement des épidermes sans mésophylle, on observe souvent une ouverture excessive des stomates, qui n'a pas lieu *in vivo*.

HARTSUIJKER (22), p. 523, dans sa comparaison de la méthode de LLOYD avec celle du poromètre prétend que les ouvertures des stomates d'épiderme avec mésophylle correspondent mieux aux observations porométriques et à l'état *in vivo* que les ouvertures des stomates d'épiderme sans mésophylle. Il indique que la méthode de LLOYD appliquée à des épidermes sans mésophylle ne convient pas aux objets étudiés par lui, c. à. d. aux *Pelargonium peltatum* et *Aster Tripolium*. Mais HARTSUIJKER n'a fait que comparer ses résultats avec la méthode porométrique indirecte. A notre avis, des mesures porométriques ne permettent pas la conclusion tirée par cet auteur.

ALEXANDROV et CHAKHNASHVILI (1) ont utilisé de très petits morceaux d'épidermes (2 mm²) avec très peu de mésophylle.

Mme SCHORN (48), p. 791, utilisa des coupes d'épiderme avec peu de mésophylle. Elle les préférait aux épidermes, obtenus sans mésophylle, parce que chez les objets étudiés par elle, ces coupes présentaient en certains endroits des stomates largement ouverts. Ces larges ouvertures ne correspondent pas, d'après Mme SCHORN, à l'état naturel, puisqu'elle ne les a jamais constatées lors de l'observation directe sur les feuilles intactes. Il n'y a que sur les épidermes où

les cellules annexes étaient blessées, qu'elle a pu observer des stomates si largement ouverts.

Cependant, nous n'avons jamais pu observer sur les épidermes sans mésophylle étudiés par nous à l'aide de la méthode de LLOYD, des stomates plus largement ouverts que ceux qui sont observés à l'aide des méthodes de comparaison. Dans le cas où au moyen des ces dernières méthodes, les stomates ont été trouvés fermés ou très peu ouverts, ils l'étaient également dans l'alcool.

Nous n'avons trouvé dans la littérature qu'une seule allusion au fait que dans le cas de coupes d'épiderme avec mésophylle, c'est ce dernier qui peut influencer le rétrécissement des ouvertures des stomates. C'est SOLOVSKY-IRTEL v. BRENNDOFF (52), p. 34, qui fait la remarque suivante: "l'épiderme s'est détaché avec le parenchyme, ce qui pouvait diminuer l'ouverture des stomates". Malheureusement, excepté cette remarque, on ne trouve chez elle rien d'autre à ce sujet.

Nous résumons: chez les espèces à épiderme facilement détachable, les ouvertures des stomates d'épiderme sans mésophylle étaient toujours plus larges que celles d'épidermes avec mésophylle et correspondaient mieux aux grandeurs d'ouvertures mesurées par les méthodes de comparaison.

Dans le tableau No. VIII, on trouve quelques exemples de mesures concernant l'état d'ouverture des stomates sur des morceaux d'épidermes préparés avec ou sans mésophylle dans l'alcool, comparées aux résultats des méthodes de contrôle.

Tandis que, dans les expériences se rapportant au tableau No. VIII, on s'est servi de feuilles ou coupes diverses, on a exécuté aussi les mesures sur la même région d'une seule feuille par 2 méthodes. Un morceau de feuille a d'abord été étudié à sec (à l'aide de l'illuminateur). Puis, on a exécuté dans cette même région une coupe tangentielle, qui contenait des plages aussi bien avec que sans mésophylle. Cette coupe était observée soit à sec, soit dans l'alcool. On a trouvé de nouveau que les ouvertures mesurées avec l'"Opak" correspondaient plus à celles, des stomates dans l'alcool, des épidermes sans mésophylle qu'à celles, avec mésophylle.

Quand on coupe avec le mésophylle l'épiderme du type détachable par arrachement, on se rapproche du cas de l'épiderme non

détachable, qu'on est obligé de couper toujours avec mésophylle. Cependant ici, le contact entre le mésophylle et l'épiderme est moins intime (quelquefois négligeable, p. ex. *Solanum nigrum*).

Pour établir si chez les épidermes coupés avec mésophylle, le rétrécissement des ouvertures (ou bien leur fermeture complète) a lieu au moment de l'exécution de la coupe, ou bien pendant la fixation, on a fait des préparations d'épidermes en partie avec mésophylle et en partie sans mésophylle, et on les a observées à sec, entre lame et lamelle. Chez *Medicago sativa*, la moyenne des largeurs des stomates observés à sec était 9.2μ pour épidermes avec mésophylle aussi bien que sans. Ce fait nous montre que chez cette espèce, ce n'est pas la coupe qui influence les ouvertures des stomates.*)

Après la mesure des épidermes à sec on a ajouté de l'alcool absolu à ces mêmes coupes, qui se trouvaient entre lame et lamelle et on a mesuré les stomates dans l'alcool. Les stomates des épidermes sans mésophylle se rétrécirent un peu dans l'alcool. (la moyenne de leur ouverture dans ce liquide était 7.9μ), mais la valeur de ces changements s'approche des erreurs d'observation et n'a pas, en général d'importance pratique. Les stomates des épidermes avec mésophylle se rétrécirent beaucoup plus au moment de la fixation dans l'alcool: la moyenne des ouvertures s'abassa jusqu'à 2.7μ ! On a remarqué sur des coupes beaucoup de stomates à ouverture faible, et même quelques-uns fermés. Cet état d'ouverture ne correspond plus du tout à l'état naturel. Ces observations ont très nettement démontré: 1°/ que chez *Medicago sativa* et d'autres types de feuilles à épiderme non adhérent (dont certains exemples sont cités dans le tableau No VIII), la coupe de l'épiderme avec ou sans mésophylle ne change pas l'état naturel des stomates, puisque, avec les méthodes de comparaison appliquées à la feuille intacte (immersion, illuminateur "Opak"), on trouve les mêmes ouvertures qu'après la coupe, mais avant leur immersion dans l'alcool; 2°/ que c'est pendant la "fixation" que les stomates d'épidermes, coupés avec mésophylle, se rétrécissent considérablement. Leur degré d'ouverture, après la fixation, ne correspond plus du tout à l'état naturel. Les stomates d'épidermes préparés sans mésophylle, se rétrécissent également pendant la fixation, mais très peu.

*) On s'est assuré à l'aide des méthodes de comparaison appliquées à la même feuille que le degré d'ouverture à sec, soit avec, soit sans mésophylle, correspondait en effet à l'état naturel.

b) ORIGINE DES MOUVEMENTS STOMATIQUES DEFAVORABLES A LA
METHODE DE FIXATION.

Comme nos observations l'ont démontré, la méthode de LLOYD est applicable aux feuilles possédant un épiderme facilement détachable et en même temps des parois minces et peu cutinisées. Par contre, dans le cas des épidermes fortement adhérents au mésophylle et à parois épaisses et fortement cutinisées, les stomates exécutent des mouvements soit au moment de la coupe, soit pendant la fixation. Ces mouvements rendent impossible l'application de la méthode de LLOYD. Dans le troisième groupe (épiderme facilement détachable), les observations sont d'accord avec l'hypothèse de LLOYD: l'alcool déshydrate les membranes si rapidement que l'état d'ouverture des stomates persiste.

Pour les mouvements qui rendent la méthode de LLOYD inapplicable, il y a principalement trois facteurs qui doivent être considérés. Ce sont : 1°/ des variations de la turgescence *in vivo*, 2°/ des mouvements produits par des changements dans la tension des tissus, qui ont lieu également pendant la vie, et 3°/ les mouvements postmortels, produits par un mécanisme de rétrécissement ou gonflement des membranes stomatiques et épidermiques, que l'auteur a discuté déjà dans sa première publication (35).

Les variations de turgescence ne jouent pas de rôle si l'on travaille assez vite. Dans les coupes observées à sec, ces mouvements se manifestent comme réaction hydroactive de fermeture des stomates vivantes.

Il nous semble bien établi que le changement de la tension des tissus produit par la coupe joue un rôle essentiel dans l'état des stomates et il est probable que les mouvements qui se manifestaient dans le groupe Ib, c. à. d. *Citrus*, *Ceratonia*, *Pittosporum* peuvent être attribués à ce changement.

LLOYD (28), p. 24, prétend, que l'enlèvement de l'épiderme provoque probablement un léger rétrécissement dans toutes les dimensions, mais il suppose que son effet sur les stomates est très petit, de sorte que les différences avant et après l'enlèvement sont négligeables. D'après lui, ce rétrécissement est temporaire et il le compare aux pressions sur un ballon de caoutchouc: si la pression est sup-

primée, le ballon reprend sa forme primitive. Comme on le sait, STALFELT est d'avis que tout enlèvement et toute coupure d'épiderme provoquent des changements dans l'appareil stomataire, puisqu'il existe un équilibre dynamique de tension entre les cellules épidermiques et le reste du tissu des feuilles, qui est troublé par ces opérations.

Des changements dans la tension existant entre les différentes cellules épidermiques se manifestent dans le fait, observé au cours de nos expériences, que les stomates de la périphérie des coupes sont parfois plus largement ouverts que ceux, situés au centre (*Eucalyptus*, *Ficus*).

LLOYD (28), p. 25, quoique n'ayant pas observé ce phénomène sur ses objets (*Fouquieria splendens* et *Verbena ciliata*), cite des observations de KOHL. Celui-ci fait à la méthode d'enlèvement de l'épiderme le reproche suivant: les stomates périphériques orientés parallèlement à la ligne suivant laquelle a été commencée la coupe de l'épiderme, sont plus ouverts que ceux situés loin de cette ligne ou que ceux situés sur le bord, mais orientés perpendiculairement à la coupe. Ces changements dans la forme de l'ouverture sont probablement la conséquence de la diminution de la pression dans la zone périphérique des coupes. En admettant cette critique de KOHL, il faut donc, selon LLOYD, accepter l'hypothèse d'une influence mécanique des cellules épidermiques voisines sur la forme des stomates.

Le fait que les cellules épidermiques influencent l'état d'ouverture des stomates *in vivo* est bien connu dans la littérature. HAGEN (18) a conclu dans son étude sur les feuilles persistantes que, dans certaines conditions, les cellules voisines des stomates influencent leur état d'ouverture. L'influence des cellules épidermiques sur le mouvement des stomates *in vivo* est également discutée par STRUGGER et WEBER (60) qui ont fait leurs observations sur le *Galium Mollugo*. Selon STALFELT (55), p. 201, le fait que les stomates sont plus largement ouverts sur le pourtour des coupes qu'à leur intérieur est à expliquer par le fait qu'on supprime une pression extérieure.

Quant à la fermeture des stomates pendant la fixation, on peut l'expliquer par plusieurs causes: 1^o/ contraction inégale des couches différentes qui composent les parois stomatiques, 2^o/ contraction inégale de l'épiderme par rapport au tissu du mésophylle, 3^o/

différences dans la vitesse de fixation. La fixation par l'alcool sera d'autant plus lente que l'épiderme est rattaché dans la coupe à plus de mésophylle. Quand l'épiderme est lié dans la coupe à beaucoup de mésophylle, on comprend que la déshydratation lente cause ou bien des mouvements hydroactifs *in vivo*, ou bien une contraction des parois stomatiques *post mortem*, qui doit provoquer également un rétrécissement des stomates.

La mesure dans laquelle la structure spéciale des différentes cellules (stomates, épiderme, mésophylle) est responsable de l'effet complexe des mouvements stomatiques ne peut, naturellement, être décidée que par des études spéciales, qui dépassent les limites de nos recherches actuelles.

c) COURBURES DES COUPES EPIDERMiques.

Nous jugeons opportun de relater ici nos observations au sujet des courbures qui ont été observées au cours de nos études sur la fixation des épidermes dans l'alcool, quoique n'entrant pas directement dans le sujet étudié.

Pendant la coupe et la fixation des épidermes (coupes tangentielles) on a observé des courbures qui ont lieu dans l'air et surtout dans l'alcool. Les épidermes d'une partie de nos objets de type à mésophylle non adhérent, coupés avec mésophylle ou bien enlevés sans mésophylle, se courbent déjà dans l'air; la courbure s'accroît dans l'alcool de telle façon que la face externe de l'épiderme forme la partie concave. Cette courbure est plus importante dans le cas des coupes d'épiderme sans mésophylle que dans celui des coupes d'épiderme avec mésophylle.

Pour les épidermes du type adhérent et pour quelques espèces à épiderme non adhérent (*Medicago sativa*, *Vinca rosea*, etc.) on a pu observer que les coupes se courbent dans l'air, et davantage encore et plus vite dans l'alcool, mais dans un sens opposé. En ce cas, la courbure de l'épiderme est convexe.

Le fait que les préparations d'épiderme peuvent se courber, est brièvement mentionné par LLOYD (28), p. 82. Il écrit: "Quand les morceaux d'épiderme sont placés dans l'alcool absolu, il faut noter qu'ils deviennent plus ou moins courbés. Ceci est probablement dû à

la cuticule, qui empêche une action synchronique de l'agent fixateur sur toutes les parties du tissu. L'effet sur une seule cellule est faible et peut être négligé".

Comme LLOYD, nous sommes d'avis que les courbures elles-mêmes ont une influence négligeable sur l'état d'ouverture des stomates pendant la fixation. Ce n'est pas surprenant. Même quand le rayon de courbure est assez petit, la contraction (ou bien l'extension) relative des surfaces de l'épiderme est négligeable par rapport à sa longueur préalable, à cause de l'épaisseur relativement faible de l'épiderme lui-même. Cette considération s'applique naturellement aussi bien à l'état *post mortem* qu'à celui *in vivo*. Par analogie, LLOYD (28), p. 24, souligne, que les courbures des feuilles vivantes, qui sont observées au commencement de la fanaison, n'influencent pas la largeur des stomates.

La courbure convexe de la face externe de l'épiderme est l'expression d'une différence de contraction entre les parties extérieure et intérieure. Cette différence est causée par une déshydratation différente de ces deux parties pendant le dessèchement dans l'air ou bien l'immersion dans l'alcool. Les parties cutinisées extérieures se rétrécissant moins que les parois cellulosiques intérieures, les morceaux d'épidermes exécutent ces courbures convexes.

Comme on le sait par les publications de MARTENS (30, 31) et COMBES (7), l'extensibilité de la cutine est de beaucoup plus faible que celle de la cellulose. COMBES insiste aussi sur le fait que les membranes cutinisées ne se gonflent que très peu.

Il nous reste à essayer d'expliquer pourquoi, chez certains épidermes du type facilement détachable, ceux-ci exécutent des courbures concaves. Un des facteurs pourrait être l'arrachement lui-même. L'arrachement ne peut pas être aisément effectué sans une courbure de l'épiderme dans un tel sens que la partie cutinisée externe forme la partie concave, mais nous supposons que des courbures de ce genre ne sont annulées que partiellement par l'élasticité du tissu épidermique. FREY-WYSSLING (13) admet aussi que ces courbures élastiques ne s'annulent pas complètement après l'arrachement.

d) CONCLUSIONS.

Avec ces observations, nous terminons notre étude à propos de l'applicabilité de la méthode de LLOYD.

D'après nos comparaisons avec les autres méthodes, on a vu que celle de LLOYD est applicable à certaines plantes. LLOYD, en publiant sa méthode de fixation des épidermes à l'aide de l'alcool, n'a donné aucune vérification établissant d'une manière convaincante qu'elle fût toujours applicable. Comme OPPENHEIMER (38) l'a déjà mentionné, on retrouve chez LLOYD comme vérification unique la comparaison de mesures des stomates dans l'eau et dans l'alcool absolu. Dans ses tableaux, p. 26, 27, on voit réellement les ouvertures dans l'eau et dans l'alcool présenter les mêmes grandeurs. Mais comment saurait-on accepter que les mesures dans l'eau montrent l'état naturel *in vivo*?

C'est un fait bien connu par SCHWENDENER (50), HARTSUIJKER (22), Mme SCHORN (48) et autres, que l'eau ne préserve pas l'état naturel des grandeurs d'ouverture des stomates; nous avons également pu nous en rendre compte nous-mêmes sur nos objets. LLOYD lui-même cite l'exemple de *Verbena ciliata*, où l'eau ne conserve pas l'état naturel des stomates, mais en provoque l'ouverture.

Nous croyons que ce n'est que par la comparaison des résultats obtenus avec la méthode de fixation de LLOYD aux observations directes (et indirectes), que nous avons prouvé d'une façon incontestable que cette méthode est applicable seulement à certaines plantes (feuilles à épidermes non adhérents) et pas à d'autres. On voit donc que les paroles de RENNER (46) "la méthode de LLOYD est aussi utile que dangereuse" sont justes.

Par ces méthodes de comparaison, nous avons également démontré, que les coupes d'épiderme sans mésophylle conviennent mieux pour la fixation dans l'alcool que celles avec mésophylle.

III. MODIFICATION DE LA METHODE DE FIXATION.

a) ALCOOL à 96°.

Il nous a paru intéressant de rechercher s'il y a d'autres liquides capables d'être substitués à l'alcool absolu pour la fixation des stomates.

Il est connu qu'en général, l'alcool produit une contraction des tissus végétaux délicats. Il nous paraissait important de vérifier, s'il y a des différences dans l'action de l'alcool absolu et celui à 96°. Comme on le sait, LLOYD (28) prétend que l'usage de ce dernier ne causerait qu'une fixation incomplète des stomates et fausserait, par conséquent, les résultats de la méthode. Nous avons donc essayé l'action de l'alcool à 96° sur quelques-uns de nos objets qui d'après nos observations, se prêtent bien à l'application de la méthode de LLOYD. On a obtenu des résultats satisfaisants avec des morceaux d'épiderme sans mésophylle de *Vinca rosea* et *Solanum nigrum*, en les plongeant dans une quantité d'alcool à 96° plus grande que celle, dont on se sert d'habitude avec l'alcool à 100°. Toutefois, dans le cas de *Plantago Lagopus* et *Chenopodium murale*, les ouvertures des stomates se rétrécissaient beaucoup plus que dans le cas de l'alcool absolu.

Quand on effectue des coupes d'épiderme avec du mésophylle que l'on trempe ensuite dans une quantité relativement petite d'alcool à 96°, l'eau, sortant de ces tissus, dilue l'alcool d'une façon considérable, de sorte que, dans certains cas, la déshydratation peut être trop lente pour conserver l'état naturel des stomates. Le même fait peut se produire, si l'on immerge une quantité relativement grande de coupes dans une quantité relativement petite d'alcool absolu.

TAGEEVA (61) a utilisé avec succès l'alcool à 96° pour fixer les stomates de variétés de Blé.

LLOYD (28), p. 28, a constaté que l'on n'obtient pas le même degré d'ouverture des stomates en plongeant dans l'alcool des feuilles entières ou des morceaux de feuilles, au lieu de morceaux d'épidermes. Dans le premier cas, selon lui, la quantité d'eau contenue dans les tissus des feuilles dilue l'alcool absolu jusqu'au degré où il devient

déjà inefficace. Par conséquent, les stomates se rétrécissent ou même se ferment. Il importe donc en général, de ne pas trop diluer l'alcool par l'eau des objets plongés, tandis qu'il semble permis, au moins dans le cas des deux espèces mentionnées plus haut, de se servir de l'alcool à 96°.

b) FIXATEURS CYTOLOGIQUES.

Dans un article, publié en 1935 (35), l'auteur a essayé de remplacer l'alcool comme fixateur des stomates de *Citrus*, *Solanum tuberosum*, etc., par d'autres liquides plus propres à ce but. Les seules expériences publiées avant et connues de nous, dans lesquelles des liquides autres que l'alcool absolu ont été employés pour la fixation des stomates sont celles de SHREVE (49). Elle se servit d'un mélange d'acide picrique, généralement connu comme fixateur, et d'huile de cèdre, qui éclaircit les tissus. On doit toutefois remarquer que l'auteur elle-même considère cette invention comme tout à fait empirique et de valeur encore douteuse. Elle ne la compare qu'avec la méthode de LLOYD.

Nous avons étendu ensuite ses recherches, en utilisant les fixateurs suivants :

LISTE DES LIQUIDES EMPLOYÉS EN VUE DE LA FIXATION DES MEMBRANES

1) *Acide acétique pur*

2) *Mélange de Carnoy* a et b : a) alcool, 3 parties ; acide acétique pur, 1 partie ; b) alcool, 6 parties ; acide acétique pur, 1 partie ; chloroforme, 3 parties.

3) *Formaldéhyde 4%* (c. à. d. 1 partie formol de commerce (40%) et 9 parties d'eau).

4) *Mélange de Boveri* : acide acétique pur et acide picrique. cf. SCHNEIDER et ZIMMERMANN (47), p. 65. (Jenaische Ztsch. f. Naturwiss. 21, 1887).

eau saturée avec acide picrique	100 parties
eau	200 parties
acide acétique pur	3 parties

5) *Acide chromique-acétique* (d'après STRASSBURGER) cf. SCHNEIDER et ZIMMERMANN (47), p. 64.

Acide chromique	0,7 gr.
Acide acétique	0,5 cm ³
Eau	100 cm ³

- 6) *Acide chromique-acétique d'après CHAMBERLAIN* (d'après "Methods in Plant Histology", Chicago 1905) cf. SCHNEIDER et ZIMMERMANN (47), p. 64.

Acide chromique	1 gr.
Acide acétique pur	1 cm ³
Eau	100 cm ³

- 7) *Acide chromique-acétique d'après RAWLINS* (1933. *Phytopathological and botanical Research Methods*, New York)

Acide chromique	0,3 %
Acide acétique	1,5 %

- 8) *Mélange de Kaiser*

Sublimé	10 gr.
Acide acétique pur	3 gr.
Eau	300 gr.

- 9) *Acide picrique-osmique-acétique par* (d'après RATH) cf. SCHNEIDER et ZIMMERMANN (47), p. 67.

Eau saturée avec acide picrique	100 cm ³
2% acide osmique	6 cm ³
Acide acétique pur	1 cm ³

- 10) *Solution de formaldéhyde d'après RAWLINS*

Alcool	2 parties.
Formol	1 partie

On a pu constater, qu'aucun de ces fixateurs n'a conservé l'état naturel d'ouverture. Une fermeture a toujours eu lieu. Pendant que toutes les autres méthodes de comparaison utilisées par nous montraient les stomates ouverts, ceux-ci étaient toujours fermés dans les fixateurs énumérés ci-dessus. On voit donc que tous ces fixateurs, dont la majorité est connue comme de bons fixateurs du protoplasma ne conviennent pas pour fixer les membranes. Le mécanisme de la fixation du protoplasma est tout à fait différent de celui de la membrane.

c) DIOXANE ET ACETONE.

Étant donné que la fixation des membranes dépend tout d'abord de la vitesse et du degré de la déshydratation, on a cherché encore d'autres liquides à propriétés fortement déshydratantes. Les liquides qu'on a appliqués avec succès ont été l'acétone et le dioxane.

Dans toutes nos observations avec l'acétone, son action était semblable à celle de l'alcool. Comme on le voit d'après le tableau No.

IX, l'acétone fixe presque l'état naturel, en causant un peu moins de rétrécissement que l'alcool. Mais ces différences se trouvaient en général proches des limites d'erreurs. Toutefois, l'observation dans l'acétone est très difficile à cause de son évaporation très rapide.

Encouragée par le Dr. F. BERGMANN de l'Institut de Recherches Chimiques Daniel Sieff, à Rehovot, nous avons essayé le dioxane. C'est un liquide incolore, qui bout à $101,2-101,4^{\circ}$. Sa densité à $17,5^{\circ}$ est $d = 1,0380$. Il se mélange facilement avec l'eau et avec l'alcool. Le dioxane, par la déshydratation rapide qu'il provoque, conserve l'ouverture des stomates aussi bien que l'alcool. Son effet est plus régulier que celui de l'alcool, puisqu'il n'agit pas si brusquement. Dans le dioxane, on ne voit presque pas de stomates déplacés, (une cellule empiétant sur l'autre) comme c'est le cas dans l'alcool. Les ouvertures y ont une forme plus symétrique. En outre, dans le cas de petites ouvertures, dont nous citons quelques exemples dans le tableau No. IX (*Vinca rosea*, *Medicago sativa* et *Brassica oleracea*), l'état d'ouverture dans le dioxane correspond mieux à l'observation dans la paraffine (état naturel) que celui dans l'alcool.

L'observation dans le dioxane est beaucoup plus nette, puisque son indice de réfraction est plus grand que celui de l'alcool. L'indice de réfraction du dioxane à $16,8^{\circ}$ est $n = 1,42218$, celui de l'alcool à 16° est $n = 1,36326$. Le dioxane s'évapore comme l'eau, ce qui le rend beaucoup plus agréable et plus commode que l'alcool absolu pour l'observation microscopique.

L'action fixatrice du dioxane a aussi été utilisée avec succès sur des coupes tangentielles et transversales de feuilles avant leur coloration au Soudan III, Rouge de ruthénium et autres colorants, dont on s'est servi pour l'analyse histo-chimique des stomates. Ces coupes, fixées par le dioxane, s'étaient beaucoup moins ridées et leur observation était plus commode que dans le cas de fixation par l'alcool. La fixation de coupes de ce genre par le dioxane est donc, dans beaucoup de cas, à préférer à celle par l'alcool.

Le tableau No. IX ci-dessous montre les grandeurs des ouvertures stomatiques dans le dioxane et dans l'acétone, comparées à celles dans l'alcool et pendant l'observation *in vivo* dans la paraffine. D'après ce tableau, on voit que dans le dioxane et dans l'acétone aussi bien que dans l'alcool, les ouvertures des stomates des épidermes sans mésophylle sont plus larges que celles des épidermes avec mésophylle. Ce sont aussi les ouvertures des stomates d'épiderme sans mésophylle

qui correspondent le mieux à l'état naturel (indiqué dans ce tableau No. IX par l'observation dans la paraffine à l'aide de l'objectif à immersion).

TABLEAU No. IX

Moyenne d'ouverture des stomates d'épiderme avec et sans mésophylle dans l'alcool, le dioxane et l'acétone, et *in vivo* dans la paraffine.

Espèce	Moy. d'ouv. des stomates dans l'alcool		Moy. d'ouv. des stomates dans le dioxane		Moy. d'ouv. des stomates dans l'acétone		Moyenne d'ouverture des stomates observés à l'aide d'immersion dans la paraffine
	Epiderme ss.mésoph.	Epiderme avec més.	Epiderme ss. més.	Epiderme avec més.	Epiderme ss. més.	Epiderme avec més.	
	en μ	en μ	en μ	en μ	en μ	en μ	en μ
<i>Solanum nigrum</i>	4.4	2.8	4.5	3.6	5.1	3.8	6.0 état d'ouverture irrégulier
<i>Vinca rosea</i>	5.3	1.2	5.7	1.9	5.3	0.5	6.1
"	1.0 fentes	fentes, fermés	2.1	1.7	2.3	1.5	2.6
<i>Medicago sativa</i>	5.6	0.6 fentes	6.5	1.2	5.3	3.5	6.6
"	0.9 fentes	fentes, fermés	1.9	0.7	2.2	1.2	2.1
<i>Plantago Lagopus</i>	5.5	2.0	5.7	2.1	2.2		5.8
<i>Brassica oleracea</i>	fentes, fermés	fentes, fermés	1.8	1.3 fentes	2.1	1.2	2.8
<i>Dodonaea viscosa</i> *)	2.6	2.0	2.2	2.0	2.1	1.9	2.6
" *)	4.8	2.9	4.6	2.5	5.2	2.1	5.4

*) Dans le cas de *Dodonaea viscosa*, les stomates des épidermes, présentés dans les colonnes „sans mésophylle” avaient quelquefois très peu de mésophylle; ceux, présentés dans les colonnes „avec mésophylle” en avaient beaucoup plus.

D'après ce qui précède, on a trouvé que l'acétone et le dioxane ont la même action sur la fixation des stomates que l'alcool. Ces deux liquides, aussi bien que l'alcool, ne provoquent presque pas de changement dans l'état d'ouverture des stomates.

IV. MOUVEMENTS DE GONFLEMENT POSTMORTELS.

L'auteur a démontré dans sa communication (35) qu'il existe chez *Citrus sinensis* et *Solanum tuberosum* des mouvements postmortels des stomates, produits par le gonflement ou le rétrécissement inégal des couches composant leurs membranes. Elle a déduit de ses expériences qu'il n'y a pas pour les membranes comme pour le protoplasma une fixation *sensu stricto*: les stomates conservent donc après le traitement avec des liquides déshydratants, leur capacité d'ouverture et de fermeture. Si on les transfère dans des liquides, qui modifient le degré de gonflement des substances membranaires, il arrive souvent qu'ils modifient leurs ouvertures stomatiques. Une fixation des stomates n'existe donc que d'une façon relative: l'appareil stomataire, arrivé une fois à un équilibre de gonflement dans un milieu liquide donné, ne changera pas le degré de son ouverture, pourvu qu'il ne soit pas transféré dans un autre liquide qui influence dans un sens différent le degré de gonflement des membranes.

Dans le même article, nous avons établi que des auteurs compétents n'admettaient jamais l'existence d'une véritable fixation des membranes végétales.

STEINBRINCK (59) a discuté ce problème. Il a traité les membranes par l'alcool, le chloroforme, la paraffine et le baume de Canada et a conclu, qu'il n'existe pas de fixateur capable d'annihiler le pouvoir de gonflement et de rétrécissement des membranes végétales. De même FISCHER (11) insiste sur l'idée qu'il n'existe pas une fixation de la cellulose. LLOYD (28) aussi, p. 26, a mentionné le cas où les stomates de l'Agave, fixés dans l'alcool, se sont déformés après avoir été transférés dans l'huile d'oeillette.

Après s'être assuré qu'on peut "conserver" l'état l'ouverture de certains types de stomates par l'emploi de liquides déshydratants comme le dioxane ou l'acétone, on a examiné si cet état persistait après l'application de liquides produisant un gonflement des substances membraneuses. Ces recherches nécessitaient tout d'abord des études préliminaires sur l'influence de liquides à appliquer sur les membranes épidermiques.

Pour évaluer la valeur du gonflement des stomates sous l'influence de liquides différents, au point de vue de leur capacité

de faire gonfler des matières colloïdales, on s'est servi de la méthode optique. On l'a appliquée à des épidermes dans l'alcool, l'acétone, le dioxane, en se basant sur les relations bien connues qui existent entre les propriétés optiques et physico-chimiques des membranes des cellules.

FREY (12) a démontré qu'un petit degré de gonflement (dans l'alcool et l'air) correspond à une forte double réfraction et d'autre part, qu'un grand degré de gonflement (dans l'eau) correspond à une faible double réfraction. Si dans un des trois liquides cités (alcool, acétone, dioxane), les membranes possèdent une double réfraction élevée, ils y ont par conséquent un petit degré de gonflement et vice versa.

Dans un premier article (35), nous avons démontré que la valeur de la double réfraction des membranes stomatiques est plus grande dans l'alcool que dans le xylol et le benzol. Après avoir entrepris des expériences avec l'acétone et le dioxane, on s'est demandé si les membranes stomatiques étudiées par nous possèdent dans ces derniers liquides une valeur de double réfraction semblable à celle de l'alcool. On a donc mesuré dans ces trois liquides la double réfraction des membranes stomatiques sur les coupes tangentiellles ainsi que sur les coupes transversales des feuilles.

On a mesuré la double réfraction sur des préparations d'épiderme sans mésophylle ayant presque une même épaisseur, en observant les différents morceaux dans l'alcool, l'acétone et le dioxane. Ensuite, on a exécuté les mêmes opérations sur des coupes transversales de même épaisseur, obtenues à l'aide du microtome à congélation.

On a ensuite transféré ces différentes coupes de l'alcool, de l'acétone et du dioxane au xylol, et quelquefois aussi au benzol, pour mesurer leur double réfraction dans ces liquides.

De plus, on a observé la double réfraction de coupes d'épiderme (tangentiellles et transversales) immergées directement dans le xylol ou dans le benzol.

Ces mesures ont montré que : 1°/ la double réfraction dans l'alcool, l'acétone et le dioxane est presque la même, 2°/ les stomates des mêmes endroits marqués sur les membranes de *Plantago Lagopus*, *Solanum nigrum*, *Medicago sativa*, *Vinca rosea*, *Albersia Blitum*,

Brassica oleracea et autres, possèdent une double réfraction plus grande dans ces trois liquides que dans le xylol. Dans le cas où l'on a utilisé le benzol au lieu du xylol, on a obtenu les mêmes résultats. La valeur de la double réfraction dans l'alcool, l'acétone et le dioxane se trouvait comprise entre 150 et 200 μ . La double réfraction dans le xylol aussi bien que dans le benzol se trouvait comprise entre 100 et 150 μ . On a donc pu établir que le gonflement des membranes des stomates dans l'alcool, l'acétone et le dioxane est plus petit que dans le xylol et le benzol.

Après s'être convaincu par ces expériences que le xylol et le benzol font gonfler les membranes épidermiques, déshydratées précédemment par d'autres liquides, on a procédé à des expériences concernant les mouvements stomatiques causés par le xylol et le benzol.

On a appliqué le xylol, et parfois le benzol (dont l'action avait été étudiée par nous auparavant — (35) —) aux stomates "fixés" par un des trois liquides mentionnés plus haut. Dans ces expériences, les épidermes des feuilles de *Vinca rosea*, *Beta vulgaris*, *Solanum nigrum*, *Pisum sativum* et autres, étaient les sujets étudiés. (voir tableau No. X).

TABLEAU No. X.
Action du xylol sur les stomates fixés par l'alcool.

Espèce	Largeur moyenne d'ouverture des stomates dans l'alcool	Largeur moyenne d'ouverture des stomates dans le xylol
<i>Vinca rosea</i> .	7.3 μ	la plupart fermés; quelques-uns ouverts de 1 μ
<i>Solanum nigrum</i> .	8.3 μ	3.1 μ
"	5.6 μ	fermés ou 1 μ
<i>Beta vulgaris</i> .	3.4 μ	fermés
<i>Pisum sativum</i> .	4.5 μ	fermés
<i>Citrus sinensis</i> .	fermés	4.2 μ

Ce tableau No. X démontre, que les stomates des 4 plantes à membranes stomatiques tendres et peu cutinisées, citées en premier lieu, se ferment dans le xylol s'ils étaient auparavant ouverts dans l'alcool, tandis que les stomates de la feuille persistante de l'Oranger, à épiderme épais et fortement cutinisé, s'ouvrent dans le xylol s'ils étaient fermés dans l'alcool. Nous avons déjà démontré (35) qu'il existe chez les stomates étudiés par nous ces deux types de comportements envers les deux liquides mentionnés. D'après nos nouvelles observations, on peut soupçonner que la réaction des stomates de la Pomme-de-terre, étudiés en 1935, qui se ferment dans le xylol, soit typique pour les stomates foliaires des plantes basses examinées par nous.

On a trouvé pour ces espèces que le dioxane et l'acétone provoquaient toujours les mêmes réactions que l'alcool. Les stomates, fermés dans l'alcool, le dioxane ou l'acétone, sont restés fermés dans le xylol.

Il nous paraît important de citer ici quelques observations sur l'intensité de ces mouvements post mortem et le temps nécessaire pour les provoquer.

Dans le cas de grandes ouvertures, par exemple chez *Solanum nigrum*, le xylol n'a pas toujours provoqué une fermeture complète, mais une diminution de l'ouverture (de $8,3 \mu$ à $3,1 \mu$ par exemple).

Le temps nécessaire au xylol pour fermer des stomates "fixés" précédemment par l'un des trois fixateurs (alcool, acétone, dioxane) est variable. Nous avons pu remarquer que ce temps dépend entre autres du temps pendant lequel l'épiderme s'est trouvé dans le liquide fixatif. Plus le temps d'immersion de l'épiderme dans le fixateur est long, plus il faut relativement de temps au xylol pour fermer les stomates. Ainsi par exemple, il fallait 5 heures au xylol pour rétrécir de 40% les stomates d'épiderme de *Solanum nigrum*, ayant séjourné pendant trois heures dans l'alcool; il fallait 24 heures pour rétrécir de ce même degré environ des stomates de la même plante, ayant séjourné pendant 36 heures dans l'alcool.

Le temps nécessaire au xylol pour fermer les stomates, variait aussi selon les espèces. Après des séjours de même durée dans le fixateur, il fallait par exemple plus de temps au xylol pour fermer

les stomates (4μ) de *Vinca rosea* que pour fermer ceux de *Beta vulgaris* qui sont de mêmes dimensions.

Du reste, l'action de ce liquide se manifeste aussi macroscopiquement, car les épidermes, raides dans un des fixatifs (alcool, dioxane, acétone), deviennent souples et détendus dans le xylol. En outre, les épidermes sans mésophylles deviennent souvent très transparents, ce qui gêne beaucoup l'observation microscopique.

On a plongé les épidermes dans le xylol aussitôt après la coupe. On a établi ensuite que les stomates de *Chenopodium murale*, *Solanum nigrum* et autres, plongés *in vivo* dans le xylol, se fermaient toujours, même quand ils étaient ouverts *in vivo*.

En appliquant dans certains cas le benzol, on a constaté qu'il exerce une influence semblable au xylol. Chez quelques-uns de nos objets, le xylol et le benzol ont eu la même action que l'eau qui, dans la majorité des cas, provoque une fermeture des stomates.

Nous résumons : un même liquide, malgré son influence spécifique, c. à. d. le degré de gonflement qu'il confère aux membranes en général, peut donc exercer un effet différent et même opposé, selon l'anatomie et la constitution chimique des stomates. Un même degré de gonflement chez un type de stomate (distingué au point de vue anatomique et chimique) peut être, dans un cas, associé à une fermeture complète, dans un autre cas à un rétrécissement, dans un troisième cas à un mouvement d'ouverture.

Les causes de ces mouvements postmortels et leurs effets différents selon les types des stomates, peuvent être étudiés à la fois de deux points de vue, comme nous l'avons fait dans notre première publication (35) : 1°/ du point de vue physico-chimique (la matière des stomates, c. à. d. leurs couches celluloseiques et cutinisées, douées d'une capacité différente de gonflement), 2°/ du point de vue histologique-anatomique (construction mécanique des membranes stomatiques).

V. HISTOCHIMIE ET ANATOMIE DES STOMATES ETUDIÉS.

Il est évident que la structure mécanique et chimique des cellules stomatiques et épidermiques doit servir de base à l'explication des mouvements stomatiques, surtout dans l'état post mortem. Comme nous l'avons déjà mentionné, il serait nécessaire de connaître exactement tous les facteurs spécifiques, entre autres l'épaisseur différente des membranes, la capacité de gonflement variée et les propriétés élastiques différentes des couches cutinisées, cellulósiques, etc. qui jouent un rôle dans ces mouvements. Une telle étude dépasserait les limites de ce travail. Nous nous sommes bornés jusqu'ici à déterminer quelque peu la structure des membranes épidermiques chez nos objets.

SCHWENDENER (50) souligne l'importance pour les mouvements *in vivo* des parties épaisses et minces (charnières) des membranes stomatiques. L'amplitude des mouvements stomatiques est large que dans le cas de membrane cutinisée et épaisse et à lumen étroit. Il est probable que, pour les mouvements postmortels également, ces parties jouent un rôle primordial. C'est pourquoi nous avons essayé d'observer certains détails de la construction des stomates et de l'épiderme. Nous l'avons fait, premièrement par la méthode polarimétrique, deuxièmement par l'observation de la fluorescence différente de la cutine et de la cellulose, et enfin par les analyses histo-chimiques.

I. A l'aide de la double réfraction différente de la cellulose et de la cutine, on a pu distinguer très nettement la localisation de ces deux éléments dans les membranes épidermiques et stomatiques. La double réfraction, observée uniquement à l'aide de nicols croisés, nous montre seulement des différences d'éclairement dans les différentes parties du sujet étudié. (Une photo, No. 7 de *Dodonae viscosa* est reproduite).

D'autre part, en se servant, en plus de nicols croisés, d'une plaque de gypse, les divers degrés de la double réfraction deviennent plus nettement visibles par les différentes couleurs d'interférence.

Selon les épaisseurs des coupes transversales et pour les mêmes substances observées, on obtient aussi des couleurs différentes d'interférence. D'après le passage plus ou moins brusque d'une couleur à une autre on peut déduire qu'il y a passage plus ou moins brusque d'une matière à une autre. Ainsi, pour *Albersia Blitum* (épaisseur de la coupe $10\ \mu$), on a pu constater un passage très brusque du bleu au rougeâtre. Cela nous démontre que le passage de la cutine à la cellulose dans les membranes épidermiques de cette espèce est assez brusque. Dans d'autres cas, par exemple chez *Solanum nigrum*, il n'y a pas de différences aussi accentuées; le passage était beaucoup plus gradué.

II. La deuxième méthode utilisée pour rendre visible la localisation de la cutine et de la cellulose est celle de la fluorescence. On s'est basé sur les observations de HAITINGER et LINSBAUER (1935, p. 389 et 1933, p. 436) qui mentionnent, que les membranes incrustées de cutine ont une fluorescence propre (primaire) beaucoup plus vive que les membranes cellulosiques. Selon les indications de HAITINGER (19), p. 3313, nous avons observé dans l'eau, la glycérine, le formol et l'alcool des coupes tangentielles d'épidermes, ainsi que des coupes transversales.

Par la fluorescence propre, nous avons pu distinguer sur les coupes transversales les couches cutinisées qui, pour la plupart des plantes, avaient une couleur bleue très brillante, déterminée d'après le code de "Color Standard and Color Nomenclature, Robert RIDGWAY (1912) Washington" par VIII f (Pallid Methyl Blue), tandis que la cellulose avait une couleur beaucoup plus mate, plutôt bleu-gris, déterminée par le même code de couleur par VIII d (Pale-Cerulea Blue). On a trouvé ces couleurs chez *Solanum tuberosum*, *Solanum nigrum*, *Medicago sativa*, *Portulaca oleracea*, *Calendula officinalis* et autres.

Par exception, des épidermes de quelques espèces ont montré dans l'eau et dans la glycérine des couleurs différentes: la cutine, une couleur rouge brillant I b (Peach red) pour *Rosa* sp. et I f (Shrimp-Pink) pour *Dodonaea viscosa*, tandis que la cellulose avait une fluorescence rose de I f (Shrimp Pink). Chez *Plantago Lagopus*, la couche cutinisée était rouge clair (f I Shrimp Pink), la cellulose bleu-gris. D'après des observations de HAITINGER (19) les membranes épidermiques auraient en général une fluorescence propre bleu-gris.

On a aussi observé ces coupes d'épiderme en les colorant par les fluorochromes. Imitant HAITINGER et LINSBAUER (20), p. 439, on s'est servi de la Thioflavin S dans une concentration de 1 : 10.000, qui nous a permis de voir les membranes brillantes verdâtres; la cutine était beaucoup plus brillante que la cellulose.

D'après HAITINGER, la Primuline — jaune, à la concentration 1 : 10.000, est aussi capable de faire apparaître nettement les membranes cellulaires. Par ce fluorochrome, les membranes épidermiques sont douées d'une fluorescence de couleur bleu-blanchâtre, la cutine étant beaucoup plus brillante que la cellulose.

A l'aide de la fluorescence on peut bien reconnaître sur les coupes tangentielles une cutinisation accentuée autour des ouvertures des stomates, qu'on retrouve nettement sur les "cornes" extérieures correspondantes des coupes transversales.

Pour la localisation de la cutine, on a, en général, obtenu à l'aide des méthodes de la fluorescence, des résultats analogues à ceux obtenus par l'application de la méthode polarimétrique (double réfraction).

Nous avons exécuté des photographies des coupes dans la lumière de fluorescence. L'une d'elle, (*Albersia Blitum*, photo No. 8) est reproduite dans ce travail.

III. Pour l'analyse histochimique de la cellulose et de la cutine, on s'est servi de la réaction connue du chlorure de zinc iodé, qui colore la cellulose en violet et la cutine en brun. En outre, on s'est servi de l'iodure de potassium, combiné avec l'acide sulfurique, qui colorent la cellulose en bleu. Pour la cutine, on a utilisé également le Soudan III, qui la colore en rouge.

Dans la majorité des cas, en ce qui concerne la localisation de la cellulose et de la cutine, la méthode histochimique a donné des résultats correspondants à ceux des autres méthodes. Toutefois, dans certains cas, la structure épidermique n'était pas aussi nettement visible quand on appliquait les réactifs histochimiques, que lorsqu'on se servait de la méthode de la fluorescence ou bien de la polarimétrie. Ces deux dernières méthodes ont presque toujours donné des résultats concordants.

Dans le cas de *Rosa* sp., on peut mieux constater par la fluorescence que par la coloration au Soudan III, qu'il existe une sorte de cuticule interne très mince. L'existence d'une telle cuticule interne est discutée par ARZT (3).

Chez *Solanum tuberosum*, sur coupes transversales, les "cornes" extérieures cutinisées des stomates sont mieux distinguées par leur fluorescence brillante bleu-grise que par la teinture avec le Soudan III.

Nous avons constaté, que ces trois méthodes sus-mentionnées sont, en principe, applicables aux investigations de la structure épidermique des feuilles.

IV. Par des études anatomiques, on s'est convaincu que notre classification des feuilles selon l'adhérence de l'épiderme au mésophylle concorde avec des caractères structuraux des stomates. Dans le groupe à épiderme adhérent dont nous représentons comme exemple *Ficus nitida* (Fig. No. 1) et *Eucalyptus rostrata* (Fig. No. 2), on trouve des membranes épaisses et fortement cutinisées. Les lumens des cellules de fermeture sont très étroits. La construction de l'appareil stomataire chez *Eucalyptus* ressemble à celle du *Melaleuca acerosa* étudiée par Joh. MENZ, citée par HABERLANDT (17) et de *Pistacia Lentiscus*, étudiée par v. GUTTENBERG (16). On y trouve une antichambre extérieure conique bien développée.

Les stomates de *Ficus nitida*, ressemblant à ceux des *Stackhousia spathulata* et *Cyrilla racemiflora*, étudiés par REHFOUS (45), ont une construction très compliquée. On y trouve une antichambre extérieure à becs très prononcés, une chambre sous-stomatique bien développée et une toute petite chambre médiane. Par le fait qu'il y a deux couches épidermiques, la construction de stomates s'approche du *Celastrus europaeus* (REHFOUS).

Comme exemples du type à épiderme non adhérent, nous représentons les stomates des *Solanum nigrum*, *Calendula officinalis* et *Plantago Lagopus* (Fig. 3—5). On y trouve dans les cellules annexes des membranes minces et peu cutinisées. Les stomates aussi ont des membranes relativement minces, peu cutinisées et des lumens bien développés. Il y a beaucoup d'exemples de ce type de stomates dans la littérature, p. ex. chez SCHWENDENER (50).

Les Fig. No. 6 et 7 représentant les stomates de *Rosa* "Dorothy Perkins" et *Dodonaea viscosa*, forment, comme on le voit, des types intermédiaires au point de vue anatomique entre les deux groupes précédents: les cellules épidermiques possèdent des membranes extérieures assez épaisses, alors que les membranes intérieures sont plutôt minces. Les membranes stomatiques sont moins épaisses que celles du groupe à épiderme adhérent, mais plus épaisses que celles du groupe à épiderme non adhérent. Le développement des lumens et des couches cutinisées présente aussi des caractères intermédiaires.

Nous sommes convaincus que ces modalités structurales jouent un rôle dans les diverses réactions post mortem des appareils stomataires sous l'influence des différents liquides, mais il nous semble prématuré d'entrer dans une discussion détaillée de ces relations, vu l'état actuel de nos études.

RÉSUMÉ.

Dans cet article, on a décrit des expériences qui avaient pour but d'établir les limites d'application de la méthode de mesure des stomates par la fixation à l'alcool (méthode de LLOYD). On a comparé cette méthode à d'autres: 1^o/ observation à sec des coupes tangentielles d'épidermes, 2^o/ observation directe des feuilles à l'aide d'un illuminateur "Opak", 3^o/ observation à l'aide d'un objectif à immersion plongé dans l'huile de paraffine, 4^o/ dans certains cas, on a utilisé de plus la méthode d'infiltration des liquides d'après MOLISCH et STEIN.

On a appliqué la méthode de LLOYD aux feuilles de 19 espèces. Ces observations ont conduit à la classification suivante des feuilles: 1^o/ épidermes fortement adhérents au mésophylle, 2^o/ feuilles à épidermes peu adhérents et détachables avec difficulté, 3^o/ feuilles à épidermes facilement détachables par arrachement.

On a établi que la méthode de LLOYD ne peut être appliquée avec quelque succès qu'à ce dernier groupe.

Chez les plantes du 3^{ème} groupe, on a mesuré les stomates sur des coupes tangentielles avec et sans mésophylle. On a pu constater

que l'état naturel persiste approximativement dans l'alcool pour les morceaux d'épidermes sans mésophylle. Les coupes d'épidermes avec mésophylle montrent un degré d'ouverture moindre que *in vivo*.

On a constaté que l'alcool peut être remplacé par le dioxane ou l'acétone pour fixer les stomates.

On a étudié les mouvements postmortels des stomates, causés par l'action de certains liquides, ce qui a conduit à examiner la structure anatomique et histo-chimique des stomates et spécialement la localisation de la cutine et de la cellulose. Dans ce but, on a appliqué les méthodes suivantes: 1°/ polarisation, 2°/ fluorescence et 3°/ histo-chimique, en utilisant le Soudan III et le chlorure de zinc iodé. Toutes ces méthodes donnaient des résultats identiques.

* * *

L'auteur exprime ici ses remerciements au Dr. H. R. OPPENHEIMER sous la direction duquel ce travail a été exécuté. Elle lui est reconnaissante pour ses indications concernant le mode d'exécution des expériences. Ses conseils dans la rédaction du manuscrit lui ont donné une aide inappréciable.

L'auteur adresse également ses remerciements au Dr. HERLINGER et au Dr. HIRSCHBERG de l'Institut Daniel Sief à Rehovot, chez lesquels les observations de la polarisation et de la fluorescence ont été exécutées.

Les discussions avec Dr. LINN ont contribué beaucoup à éclaircir le problème des courbures des épidermes.

Pour la mise au point du texte, nous exprimons notre gratitude à l'Ing. Agr. MOUKHWAS.

BIBLIOGRAPHIE.

- 1) ALEXANDROV, V. G. and CHAKHNASHVILI, N. D. (1930). On the conditions of the stomata on the leaves of Kakhetian grape-vines, during the development and maturation of the grapes. (Material for the knowledge of the peculiarities observed in the principal Kakhetian varieties). *"Bulletin of Applied Botany, Genetics and Plant-Breeding"*. 24, No. 1, 301—318, Leningrad.
- 2) ARTSIKHOVSKAIA, N. V., (1932). Izoutchenie razvitiia ustitchnago apparata metodom jclatinnykh otpetchatkov. (Study of stomatal development by use of gelatin imprints). *Botanicheski Journal SSSR (Journ. Bot. U.R.S.S.)* 17 (2) 154—157.
- 3) ARZT, Th., (1933). Untersuchungen ueber das Vorkommen einer Kutikula in den Blaettern dikotyler Pflanzen. *Ber. d. bot. Ges.*, 51, 470—500.
- 4) BACHMANN, F. (1922). Studien ueber Dickenaenderungen von Laubblaettern. *Jahrb. f. wiss. Bot.* 61, 372—429.
- 5) BOGDARINA, A. A. (1935). A study of burns on fruit trees resulting from the application of mineral oil emulsion sprays. (Russe avec résumé anglais). *Bulletin of plant protection IIIème sér.* (4).
- 6) BUSCAGLIONI, L., e POLLACCI, G. (1901—1902). Ulteriori ricerche sull' applicazione delle pellicole di collodio allo studio di alcuni processi fisiologici delle piante ed in particolare modo della traspirazione vegetale. *Atti R. Inst. Bot. Pavia*, 2. ser. 7.
- 7) COMBES, R. (1937). La vie de la cellule végétale. 3ème partie: L'enveloppe de la matière vivante. Paris, Armand Collin.
- 8) DARWIN, F. and PERTZ, D. F. M. (1911). On a new method of estimating the aperture of stomata. *Proc. Roy. Soc. London*, 84 B, 136—154.
- 9) DIETRICH, M. (1926). Die Transpiration der Schatten- und Sonnenpflanzen in ihren Beziehungen zum Standort. *Jahrb. f. wiss. Bot.* 65, 98—194.
- 10) EBERDT, O. (1880). Die Transpiration der Pflanzen und ihre Abhaengigkeit von aeusseren Bedingungen. Marburg.
- 11) FISCHER, Hugo. (1926). Weiteres ueber Kolloide. *Ber. d. bot. Ges.* 44, 208—212.
- 12) FREY, A. (1928). Ueber die Intericellar-Raeume der Zellmembranen. *Ber. d. bot. Ges.* 46, 444—455.
- 13) FREY-WISSLING, A. (1935). Die Stoffausscheidung der hoeheren Pflanzen. Berlin (Springer).
- 14) GRAFE, V. (1913). Gas- und Wasserbewegung in der Pflanze. (Transpiration, Spaltoeffnungsmechanismus, Wurzeldruck). *Handbuch der Biochemischen Arbeitsmethoden* (Abderhalden) 831—893.

- 15) GREGORY, F. G. and PEARSE, H. L. (1934). The resistance porometer and its application to the study of stomatal movements. *Proc. Roy. Soc. (London)* B 114 (790), 477—493.
- 16) v. GUTTENBERG, H. (1907). Anatomisch-physiologische Untersuchungen ueber das immergruene Laubblatt der Mediterranflora. *Englers. bot. Jahrb.* 38, 383—444.
- 17) HABERLANDT, G. (1929). Physiologische Pflanzenanatomie. 6ème éd. Leipzig (Engelmann).
- 18) HAGEN, F. (1916). Zur Physiologie des Spaltoöffnungsapparates. *Beitr. allg. Bot.* 1, H. 2.
- 19) HAITINGER, M. (1934). Die Methoden der Fluoreszenzmikroskopie. *Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden*, Abt. II, *Physikalische Methoden*, 3, (5), 3307—3337.
- 20) HAITINGER, M. and LINSBAUER, L. (1933). Die Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie und ihre Anwendung in der Botanik. *Beih. bot. Centralbl.* 50, Abt. I., 432—444.
- 21) HAMORAK, N. und LUBYSKYJ, M. (1930). Das Horizontal-Porometer *Planta* 9.
- 22) HARTSUIJKER, K. (1935). Kritische Bemerkungen ueber einige der wichtigsten Methoden zur Ermittlung des Oeffnungszustandes der Spaltoöffnungen. *Trav. bot. néerlandais*, 32, 516—542.
- 23) HUBER, B. (1928). Zur Physik der Spaltoöffnungstranspiration. *Ber. d. bot. Ges.* 46, 610—625.
- 24) KNIGHT, R. C. (1917). On the use of the porometer in stomatal investigation. *Ann. Bot.*, 30, 57—76.
- 25) KNIGHT, R. C. (1917). The interrelations of stomatal aperture, leaf water content and transpiration rate. *Ann. Bot.*, 31, 221—240.
- 26) KOHL, F. G. (1886). Die Transpiration der Pflanzen und ihre Einwirkung auf die Ausbildung pflanzlicher Gewebe. Braunschweig.
- 27) LEICK, E. (1927). Ein neues Universal-Doppel-Porometer. *Ber. d. bot. Ges.* 45, 43—59.
- 28) LLOYD, F. E. (1908). The physiology of stomata. *Carnegie Inst. Washington Publ.* 82, 1—142.
- 29) LOFTFIELD, J. V. (1921). The behaviour of stomata. *Carnegie Inst. Washington Pub.* 314, 1—104.
- 30) MARTENS, P. (1933). Recherches sur la cuticule. II: Dépouillement cuticulaire spontané sur les pétales de "Tradescantia". *Bull. Soc. R. de Bot. de Belgique*. 66, 58—64.
- 31) MARTENS, P. (1934). Recherches sur la cuticule. IV: Le relief cuticulaire et la différenciation épidermique des organes floraux. *La cellule* 43, 289—320.
- 32) MAXIMOV, N. A. (1929). The plant in relation to water. London. VIème chapitre. (The stomatal apparatus of the plant). 170—194.

- 33) MOLISCH, H. (1912). Das Offen- und Geschlossensein der Spaltoeffnungen, veranschaulicht durch eine neue Methode (Infiltrationsmethode). *Zeitschr. f. Bot.* 4, 106—122.
- 34) MOLOTKOVSKI, G. Kh. (1934). Jelatinovje kamery k porometru (Chambres gelatineuses pour poromètres). *Compt. Rend. Acad. Sci. U.R.S.S. nouv. sér.* 2, 48—51.
- 35) NADEL, M. (1935). On the influence of various liquid fixatives on stomatal behaviour. *Pal. Journ. of Bot. and Hort. Sci.* Vol. I, No. I, 22—42.
- 36) NIUS, E. (1931). Untersuchungen ueber den Einfluss des Interzellularvolumens und der Oeffnungsweite der Stomata auf die Luftwegigkeit der Laubblaetter. *Jahrb. f. wiss. Bot.* 74.
- 37) OPPENHEIM, J. D. (1926). Researches on the changes in the opening of stomata which occur in different species of Citrus. *Agric. Records* No. 1 of the P. Z. E. Inst. of Agric. and Nat. Hist. Tel-Aviv, 9—30.
- 38) OPPENHEIMER, H. R. (1935). Critical remarks on the value of Lloyd's alcohol fixation method for measuring stomatal aperture. *Pal. Journ. of Bot. and Hort. Sci.* Vol. I, No. I, 42—47.
- 39) OPPENHEIMER, H. R. and MENDEL, K. (1934). Some experiments on water relations of Citrus trees. Reprinted from "*Hadar*" 7, Nos. 2, 3, 6.
- 40) OPPENHEIMER, H. R. and MENDEL, K. (1938). On Orange Leaf Transpiration under Orchard Conditions. A Bioclimatic Study. *Pal. Journ. of Bot. and Hort. Sci.* Vol. II (sous presse).
- 41) PAETZ, K. W. (1930). Untersuchungen ueber die Zusammenhaenge zwischen stomataerer Oeffnungsweite und bekannter Intensitaeten bestimmter Spektralbezirke. *Planta* 10.
- 42) PISEK, A. (1935). Zur Beobachtung des Oeffnungszustandes der Spalten am lebenden Blatt. *Ber. d. Bot. Ges.* 53, 624—629.
- 43) PISEK, A. und CARTELLIERI, E. (1931). Zur Kenntnis des Wasserhaushaltes der Pflanzen. I. Sonnenpflanzen. *Jahrb. wiss. Bot.* 75, 195—251.
- 44) RADULESCU, E. (1933). Beitrage zur Kenntnis der Feldresistenz des Weizens gegen *Puccinia glumarum tritici*. *Planta* 20, 244—286.
- 45) REHFUS, L. (1917). Etude sur les stomates. *Diss. Genève* (Imprimerie Jent)
- 46) RENNER, O. (1910). Beitrage zur Physik der Transpiration. *Flora* 100.
- 47) SCHNEIDER, H. und ZIMMERMANN, A. (1922). Die botanische Mikrotechnik. Jena. (Gustav Fischer).
- 48) SCHORN, M. (1930). Untersuchungen ueber die Verwendbarkeit der Alkoholfixierungs- und Infiltrationsmethode zur Messung von Spaltoeffnungsweiten. *Jahrb. wiss. Bot.* 71, 783—840.
- 49) SHREVE, E. (1914). The daily march of transpiration in a desert perennial. *Carnegie Inst. Washington Publ.* 194, 1—64.
- 50) SCHWENDENER, S. (1881). Ueber Bau und Mechanik der Spaltoeffnungen. *Monatsber. k. Akad. d. Wiss. Berlin*, 833—867.

- 51) SIERP, H. (1933). Untersuchungen ueber die Oeffnungsbewegungen der Stomata in verschiedenen Spektralbezirken. *Flora N. F.* 28.
- 52) SOLOVSKI, IRTEL v. BRENNDORE. (1934). L'élément induit et l'élément autonome dans le rythme des mouvements du stomate chez *Impatiens Sultani* Hooker. *Diss. Genève.*
- 53) STAHL, E. (1894). Einige Versuche ueber Transpiration und Assimilation. *Bot. Zeit.* 52, 117—146.
- 54) STALFELT, J. (1928). Die stomataere Beeinflussung der Kohlensaureassimilation der Fichte.
- 55) STALFELT, J. (1929). Die Abhaengigkeit der Spaltoeffnungsreaktionen von der Wasserbilanz. *Planta* 8, 287—340.
- 56) STAEFEET, J. (1929). Neuere Methoden zur Ermittlung des Oeffnungszustandes der Stomata. *Handb. biol. Arbeitsmeth.*, Abt. XI.
- 57) STALFELT, J. (1932). Der stomataere Regulator in der pflanzlichen Transpiration. *Planta* 17, 22—85.
- 58) STEIN, E. (1912). Bemerkungen zu der Arbeit von Molisch: Das Offen- und Geschlossensein der Spaltoeffnungen veranschaulicht durch eine neue Methode. *Ber. d. bot. Ges.* 30, 66—68.
- 59) STEINBRINCK, C. (1900). Zur Terminologie der Volumenaenderungen pflanzlicher Gewebe und organischer Substanzen bei wechselndem Feuchtigkeitsgehalt. *Ber. d. bot. Ges.* 18, 217 etc.
- 60) STRUGER, S. und WEBER, F. (1926). Zur Physiologie der stomata-Nebenzellen. *Ber. d. Bot. Ges.* 44, 272—278.
- 61) TAGEEVA, S. V. (1935). On physiological Influence of Spray Irrigation during the Day Time. *Jour. of exper. Agron. of the All-Union Inst. of Grain Farming.* Narkomzen of U.S.S.R. 5, 24—45.
- 62) WEBER, F. (1923). Zur Physiologie der Spaltoeffnungsbewegungen. *Oesterr. bot. Zeitschr.* 72, 43—57.

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

LE MÉCANISME DES ÉCHANGES GAZEUX ENTRE LES VÉGÉTAUX
ET LE MILIEU EXTERIEUR

VU ET APPROUVÉ

Paris, le 6 Juillet 1938

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

CH. MAURAIN.

Vu

ET PERMIS D'IMPRIMER

Le Recteur de l'Académie
de Paris,

G. ROUSSY.

TYPES DE STOMATES DU GROUPE A EPIDERME ADHERENT



Fig. 1. Coupe transversale d'épiderme de *Ficus nitida*
(Gross. 800 fois)



Fig. 2. Coupe transversale d'épiderme d'*Eucalyptus rostrata*
(Gross. 720 fois)

TYPES DE STOMATES DU GROUPE A EPIDERME FACILEMENT DETACHABLE



Fig. 3. Coupe transversale d'épiderme de *Solanum nigrum*, (Gross. 1200 fois)



Fig. 4. Coupe transversale d'épiderme de *Calendula officinalis*, (Gross. 690 fois)



Fig. 5. Coupe transversale d'épiderme de *Plantago Lagopus*, (Gross. 1150 fois)

TYPES DES STOMATES DU GROUPE DE PASSAGE



Fig. 6. Coupe transversale d'épiderme de *Rosa "Dorothy Perkins"*, (Gross. 775 fois)



Fig. 7. Coupe transversale d'épiderme de *Dodonaea viscosa*, (Gross. 875 fois)

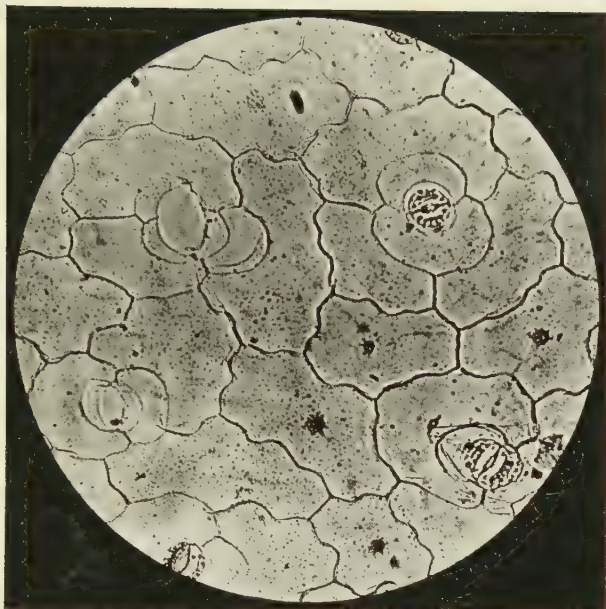


Photo No. 1. Epiderme de *Portulaca oleracea*
gross. 165 fois



Photo No. 2. Epiderme de *Plantago Lagopus*
gross. 460 fois.



Photo No. 3. Epiderme de *Vincetoxicum rosea*
gross. 145 fois.



Photo No. 4. Epiderme de *Rosa* "Dorothy Perkins"
gross. 500 fois.

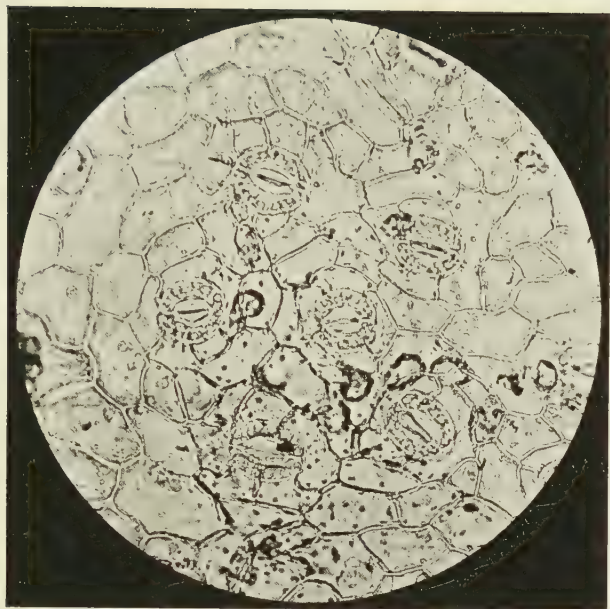


Photo No. 5. Epiderme de *Dodonaea viscosa*
gross. 400 fois.



Photo No. 6. Epiderme d'*Eucalyptus rostrata*
gross. 205 fois.

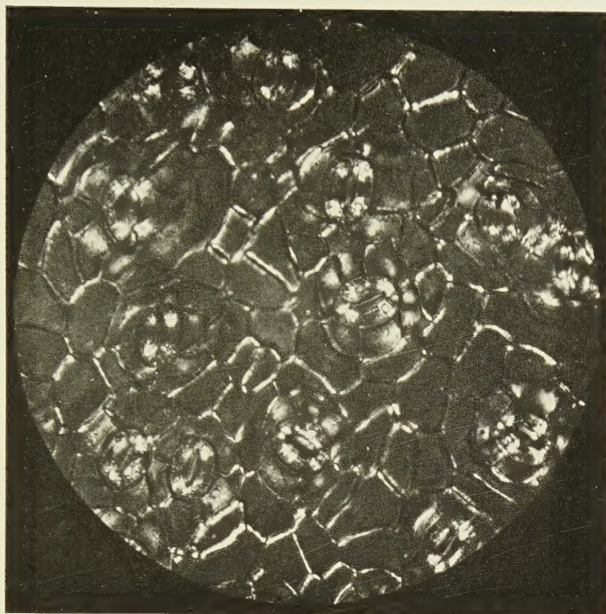


Photo No. 7 Epiderme de *Dodonaea viscosa*
(faite dans le microscope polarisant)
gross. 320 fois.

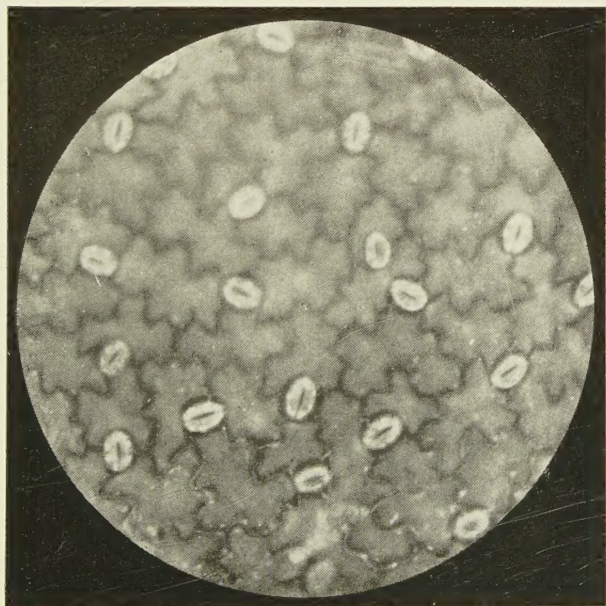


Photo No. 8. Epiderme d'*Albersia Blitum*
(faite dans le microscope à fluorescence)
gross. 270 fois.

